

بكتريا باسيلليس ثوريانجيسيز

رائدة المبيدات الحيوية



أستاذ دكتور

زيدان هندي عبد الحميد

أستاذ كيمياء المبيدات والسموم
كلية الزراعة - جامعة عين شمس

بكتريا باسيليس ثورينجينسيس

رائدة المبيدات الحيوية

أستاذ دكتور

زيدان هندي عبد الحميد

أستاذ كيمياء المبيدات والسموم

كلية الزراعة - جامعة عين شمس

كانزا جروب

بكتريا باسيليس ثورينجينسيز رائدة

المبيدات الحيوية

● الطبعة الثانية ٢٠٠٤ :

جميع حقوق الطبع والنشر © ٢٠٠٣ محفوظة للناشر:

كانزا جروب

٩ عمارات أعضاء هيئة التدريس بجامعة عين شمس
الدمرداش - القاهرة - جمهورية مصر العربية
تليفون وفاكس: ٤٨٣٥٥٤٣ - ٤٨٥٤٧١١ (٢٠٢)

لا يجوز طبع أو استنساخ أو نقل أو تصوير أي جزء من مادة
الكتاب بأي طريقة كانت إلا بعد إذن كتابي مسبق من الناشر.

رقم الإيداع

٢٠٠٣ / ١١٣٥٨

إهداء

/// إلي والدي ووالدتي رحمة الله عليهما.....

/// تحية وإعزاز وتقدير إلي زوجتي العزيزة...

أ.د. نجوي محمود محمد حسين

رئيس بحوث معهد بحوث وقاية النباتات

مركز البحوث الزراعية – وزارة الزراعة

الزوجة التي شاركتني مر الحياة وحلوها..... وكانت لي عوناً كبيراً
ولأسرتي خير راعياً..... مع الدعاء أن يحفظها الله ويرعاها.....

/// أبنائي الأعزاء/ عمرو زيدان - أيمن زيدان - خالد زيدان

وفقههم الله... فقد كانوا عوناً وسنداً لنا كل الوقت.

/// أساتذتي وزملائي بكلية الزراعة جامعة عين شمس – الجامعات
الأخرى – مراكز البحوث والمعاهد البحثية..... لما قدموه لي من
عون صادق.

/// أحفادي/ سلمى أيمن زياد عمرو سليم أيمن

المحتويات

| | |
|----|--|
| ١ | الباب الأول: ما هي بكتريا باسيلليس ثورينجينسيز: الخصائص - الوجود الطبيعي - الإنتاج. مقدمة - ما هي الباسيلليس ثورينجينسيز - التسمية - نظرة تاريخية - الاستخدام التجاري لبكتريا Bt - خصائص بكتريا باسيلليس ثورينجينسيز - معقد باسيلليس سيريس - التوصيف بواسطة الطرق التقليدية الكلاسيكية - التوكسينات - كيفية إحداث الفعل - الحدوث الطبيعي ودور الباسيلليس في البيئة - الإنتاج وتجهيز المستحضرات - الأمان البيئي لمكونات مستحضرات Bt - المنتجات. |
| ٤٣ | الباب الثاني: تأثيرات بكتريا الباسيلليس علي الحشرات والميكروبات واللافقاريات والفقاريات غير المستهدفة في البيئة. مقدمه وتقديم |
| ٤٦ | الفصل الأول: السمية علي الحشرات تقييم السمية علي الحشرات - حساسية الحشرات للباسيلليس - التشيط بين الدلتا اندوتوكسينات - مقارنة كفاءة أو فاعلية مستحضر الباسيلليس - دور الباسيلليس في موت الحشرات والآفات الأخرى. |
| ٦٨ | الفصل الثاني: تأثير بكتريا الباسيلليس علي الميكروبات واللافقاريات غير المستهدفة. مقدمة - الوضع التاريخي والمشاكل في الدراسات علي الكائنات غير المستهدفة - التأثيرات الضارة علي النباتات - الكائنات الدقيقة - اللافقاريات - الأنواع النافعة - الدراسات في النظم البيئية - استعراض للوضع والرؤى في وكالة حماية البيئة الأمريكية EPA - سمية التوكسينات الخارجية علي الكائنات غير المستهدفة. |
| ٨٨ | الفصل الثالث: تأثيرات الباسيلليس علي الفقاريات مقدمة - الأسماك والبرمائيات - الطيور - تأثير مستحضرات الباسيلليس علي الثدييات. |

الباب الثالث: العوامل البيئية وعلاقتها بثبات وسمية ونقل وانتشار بكتريا الباسيلليس في المستحضرات الحيوية لمكافحة الآفات. ١٠٥

الفصل الأول: "ثبات ونشاط مستحضرات الباسيلليس Bt في البيئة" ١١٣

الثبات في التربة- الثبات على المجموع الخضري - ثبات الباسيلليس في الماء- العوامل التي تؤثر على الثبات - تأثير المستحضر على الثبات - طرق ومعدلات الاستخدام - الكشف عن الباسيلليس والتوكسينات في البيئة.

الفصل الثاني: "العوامل البيئية وتلك المرتبطة بالحشرات التي تؤثر على سمية ونشر الباسيلليس" ١٢٩

أولاً: العوامل التي تؤثر على سمية الباسيلليس
العوامل البيئية- سلوك تغذية الحشرة- عوامل التربة- عوامل الماء- الكائنات الأخرى - البكتريوفاج
ثانياً: نقل ونشر الممرضات الحشرية: النقل الأفقي - الانتشار
ثالثاً: دور وفاعلية خلط الباسيلليس مع المبيدات الحشرية الأخرى (التداخل مع الممرضيات - التدخلات مع المبيدات الكيميائية)

الباب الرابع: المبيد الحيوي باسيلليس تورينجينسيز واستخداماته في الدول النامية ١٤٥

- ١- تطوير عزلات باسيلليس تورينجينسيز
- ٢- طرق بسيطة لاستخدام باسيلليس تورينجينسيز في المحاصيل الحقلية
- ٣- استخدام الباسيلليس تورينجينسيز في إيطاليا
- ٤- دور وكفاءة الباسيلليس تورينجينسيز في الإدارة المتكاملة للآفات
- ٥- ثبات الباسيلليس تورينجينسيز في البيئات الاستوائية
- ٦- زيادة كفاءة وفاعلية الباسيلليس تورينجينسيز للاستخدامات الحقلية
- ٧- الوراثة والبيولوجيا الجزيئية للباسيلليس تورينجينسيز.
- ٨- تطوير طريقة ELISA جديدة لقياس تركيز الدلتا-اندوتوكسين الذي ينتج بواسطة الباسيلليس تورينجينسيز Bt

| | | |
|-----|---|---------------|
| ٢٣٩ | مختارات في الدراسات التي أجريت في المعاهد البحثية والجامعات المصرية عن فاعلية وأداء سموم وأحداث الفعل في بكتريا باسيلليس ثورينجنسيس | الباب الخامس: |
| ٢٩٣ | التحديات التي تجابه الإنتاج والاستخدامات الخاصة بالبسيلليس ثورينجنسيس في الدول النامية | الباب السادس: |
| ٢٩٥ | أولا: طرق جديدة بسيطة لإنتاج وتجهيز الباسيلليس ثورينجنسيس في تايلاند | |
| ٣٠٧ | ثانيا: تطوير عملية إنتاج عالي للمبيدات الحيوية بواسطة الباسيلليس ثورينجنسيس. | |
| ٣١٨ | ثالثا: الإنتاج المحلي للبسيلليس ثورينجنسيس في مصر: المميزات والتحديات | |
| ٣٢٧ | رابعا: استخدامات تجهيزات الباسيلليس ثورينجنسيس ضد الفراشة ذات الظهر الماسي "بلوتيل زيلوستيلا" في تايوان | |
| ٣٣٦ | خامسا: التحديات والصعوبات التي تواجه استخدام الباسيلليس ثورينجنسيس في القلبين. | |
| ٣٤٥ | سادسا: تعريف وتنقية الاكسوتوكسينات الخارجية من تسعة سلالات من بكتريا باسيلليس ثورينجنسيس | |
| ٣٥٠ | سابعا: استخدام التكنولوجيا الحيوية في مكافحة الآفات باستخدام مستحضرات باسيلليس ثورينجنسيس | |
| ٣٥٨ | ثامنا: استخدام الباسيلليس ثورينجنسيس في وقاية النباتات في مصر مع تأكيد Constraints | |
| ٣٦٤ | تاسعا: قبول الفلاحين لتطبيقات مكافحة الميكروبية في مصر | |
| ٣٦٦ | عاشرا: خصائص تمثيل الباسيلليس ثورينجنسيس خلال التخمر المعمور | |
| ٣٨٥ | إدارة المقاومة لتوكسينات باسيلليس ثورينجنسيس | الباب السابع: |
| | الخلفية التاريخية والتطور الزمني للبسيلليس Bt - كيفية إحداث الفعل - توكسينات Bt - المقاومة للمبيدات الحشرية - الحفاظ على المجاميع الحساسة كي تتزاوج مع الأفراد المقاومة - استخدام مبيدات منفردة - المصائد النباتية - مشكلة المحاصيل المهندسة وراثيا بيكتريا Bt - أقوال ماثورة عن إدارة مقاومة الآفات : دراسة حالة عن البطاطس Bt - ما هو توكسين بكتريا الباسيلليس - ماذا يعني إدارة المقاومة في الآفات؟ - ما هي النواحي المحددة الفاتحة في إدارة المقاومة في الآفات؟ - كيف برز الاهتمام بنواحي أمان الغذاء؟ - العلاقات الداخلية بين العائل - الممرض/تطور المقاومة - النباتات المحورة وراثيا المقاومة للحشرات - بعض الاستنتاجات الهامة - السمية الحادة علي الإنسان - التأثيرات الأيكولوجية لبكتريا Bt - بروتوكولات تقييم فعالية المبيدات الحيوية. | |

- الباب الثامن: النباتات المهندسة وراثيا بجينات توكسينات بكتريا الباسيلليس ٤٤٣
 ثورينجنسيز Bt (التقدم والمنظور)
 الفصل الأول: أساسيات الحصول على النباتات المهندسة وراثيا بجينات توكسينات ٤٤٨
 بكتريا Bt
 البروتينات القاتلة للحشرات في بكتريا الباسيلليس ثورينجنسيز -
 النباتات المهندسة وراثيا ببكتريا الباسيلليس - مقاومة الحشرات
 الضارة للنباتات المحورة وراثيا - مدي الأمان في التوسع في زراعة
 Bt-plants
 الفصل الثاني: أمان ومميزات النباتات المحمية ببكتريا باسيلليس ثورينجنسيز في ٤٧٥
 مكافحة الآفات الحشرية
 لماذا نطور النباتات المحمية ببكتريا الباسيلليس Bt - مميزات استخدام
 المحاصيل المحمية ببكتريا الباسيلليس - اعتبارات الأمان في النباتات
 المهندسة وراثيا ببكتريا الباسيلليس Bt - الكراي
 الفصل الثالث: النباتات المهندسة وراثيا بشكل عام في كندا وأمريكا ٥٠٨
 أولا: تشريعات الأمان الحيوي
 ثانيا: نظرة سريعة عن ملامح الامان الحيوي في مصر
 للمستحضرات الحيوية والنباتات المهندسة وراثيا.
 أسئلة تتعلق بالتعريف بالأخطار التي تنشأ عن إطلاق الكائنات
 الحية الدقيقة في البيئة - المبادئ الأساسية لإعداد سياسة قومية
 لتنظيم التقنية الحيوية - تقييم الظروف البيئية - الكائنات الحية
 الدقيقة المصاحبة مع النبات.
 الباب التاسع: إنتاج المبيدات الحيوية البكتيرية والفيروسية في معهد بحوث وقاية ٥٣٩
 النباتات - مركز البحوث الزراعية - مصر.
 مجال تسجيل وتداول المبيدات - مجال تحليل متبقيات المبيدات -
 مجال مكافحة الآفات - الأنشطة البحثية لوحدة إنتاج المبيدات
 الميكروبية - الاهتمام بالمشاريع البحثية والوحدات البحثية التي تعتمد
 على وسائل مكافحة البيولوجية - المشاكل والمعوقات التي تواجه
 استخدام مكافحة الحيوية في مصر - المقترح التطويري لاستخدام
 مكافحة الحيوية في الحد من تلوث البيئة في مصر.

قائمة الجداول

| | |
|-----|---|
| ١٠ | جدول (١-١): تقسيم باسيليس ثورينجيسيز تبعا للطرز الوراثي H-serotype |
| ٢٦ | جدول (٢-١): التوكسينات المختلفة التي تنتج بواسطة سلالات الباسيليس ثورينجيسيز (مأخوذة من Krieg and Langenbruch ، ١٩٨١) |
| ٤٠ | جدول (٣-١): الأسماء التجارية وتحت الأنواع في بكتريا Bt والافات المستهدفة والأصل. |
| ٥٣ | جدول (١-٢): عدد أجناس الحشرات (الأنواع) الحساسة للأصناف السيروولوجية للباسيليس ثورينجيسيز (الأرقام خارج المربعات) التي سجلت غير حساسة (الأرقام داخل المربعات) |
| ٦٠ | جدول (٢-٢): امثلة عن مدى نشاط توكسينات Cry I ضد حشرات حرشفية |
| ٨٧ | جدول (٣-٢): الحساسية غير المستهدفة: ملخص البيانات التي ارسلت للوكالة EPA بغرض التسجيل NOEL (مستوى التأثير غير الملحوظ) ، NOEC (التركيز الذي لا يحدث تاثيرات ملحوظة ، nontoxic غير سام ، toxic سام). |
| ٩٠ | جدول (٤-٢): انواع الاسماك التي سجلت على انها غير حساسة للباسيليس ثورينجيسيز في التحليل الحيوى فى المعمل او بعد التعرض الحقلى. |
| ٩١ | جدول (٥-٢): السمية الحادة لمبيدات مكافحة يرقات البعوض على F. heteroclitus |
| ٩١ | جدول (٦-٢): الحساسية غير المستهدفة للأسماك |
| ١٠٩ | جدول (١-٣): بعض المنتجات الحيوية الهامة المنتجة بواسطة البكتريا |
| ١٤٩ | جدول (٢-٣): بعض مميزات السموم الميكروبية الخارجية والداخلية |
| ١٥٢ | جدول (٣-٣): بعض الإنزيمات الخارجية، التي تفرزها الميكروبات، ولها علاقة بالعدوى |
| | جدول (١-٤) : بيئة التخمر B- 4b |
| ١٥٢ | جدول (٢-٤): التداخل بين عد الجراثيم ونشاط العزلات المختلفة من الباسيليس ثورينجيسيز. |
| ١٥٥ | جدول (٣-٤): الارتباط بين عد الجراثيم و الفاعلية لنفس المزرعة النامية في بيئات مختلفة. |
| ١٥٦ | جدول (٤-٤): حساب كفاءة المساحيق الجافة للدلتا-اندوتوكسينات للبكتريا Bt |
| ١٥٨ | جدول (٥-٤): الحسابات الافتراضية لنسب Tn / Hu المحتوية على واحد أو اثنين من الدلتا-اندوتوكسينات ذات المدى المختلف من النشاط |
| ١٦١ | جدول (٦-٤): مقارنة فاعلية ٩ عزلات من الباسيليس ثورينجيسيز ضد أربعة حشرات من حرشفية الأجنحة وخمسة أنواع من البعوض. |

- ١٦٢ جدول (٧-٤): تأثير الوسط على انتاج الدلتا-اندوتوكسين بواسطة سلالة الباسيلليس تورينجيسيز HD-1 في وحدة تخمر ١٤ لتر.
- ١٦٣ جدول (٨-٤): تأثير حرارة التحضين على نمو وانتاج الدلتا-اندوتوكسين بواسطة الباسيلليس تورينجيسيز السلالة HD-2b3 في وحدة تخمر ١٤ لتر.
- ١٦٤ جدول (٩-٤): ثبات نسب الفاعلية لمستحضرات من تخمر خمسة عزلات من باسيلليس تورينجيسيز في مخمر سعة ١٤ لتر
- ١٦٤ جدول (١٠-٤): عملية استرجاع معقد الجراثيم- البلورات للباسيلليس تورينجيسيز على مستوى المعمل.
- ١٨٠ جدول (١١-٤): عملية استرجاع معقد الجراثيم / البلورات للباسيلليس تورينجيسيز: إنتاج على مستوى اكبر في المصانع
- ١٨٠ جدول (١٢-٤): المحاصيل التي مسجل لمكافحة افاتها بكتريا Bt ضد العديد من الافات الضارة و الجرعات من المواد الفعالة a-I (١٦٠٠٠ وحدة دولية) جم/مكتار
- ١٨١ جدول (١٣-٤): البيانات عن B.t.k. المستخدم في ايطاليا (١٩٩١).
- ١٨٩ جدول (١٤-٤): الخصائص الاساسية لتسجيل B.t.k في ايطاليا.
- ١٨٩ جدول (١٥-٤): افات حرشفية الاجنحة الزراعية ذات الاهمية الدولية كاهداف لاستخدامات بكتريا B.t.
- ١٩٩ جدول (١٦-٤): نصف فترة الحياة المقدرة لبعض الممرضات الحشرية مع ضوء الشمس الطبيعي في شمال امريكا.
- ٢٠١ جدول (١٧-٤): طرق إطالة النشاط الباقي الفعال لبكتريا Bt المعرضة للأشعة فوق البنفسجية.
- ٢٠٢ جدول (١٨-٤): الفاعلية النسبية لبعض المواد الماصة لأشعة UV لبكتريا Bt تحت الظروف البيئية المصرية.
- ٢٠٢ جدول (١٩-٤): الموت ونشاط التغذية لحشرة M.Coofigurata على نباتات الكانولا المعاملة ببكتريا Bt مع التعريض لمصفاة امتصاص الأشعة.
- ٢٠٦ جدول (٢٠-٤): فعالية مستخلصات النباتات العائلة على كفاءة بكتريا B.t. الصنف انتوموسيدس ضد دودة ورق القطن.
- ٢٠٨ جدول (٢١-٤): تأثير التركيزات المختلفة من مستخلص اثيرالبترو لاوراق القطن على كفاءة بكتريا B.t. الصنف entomocidus ضد دودة ورق القطن.
- ٢٠٩ جدول (٢٢-٤): تأثير منشطات التغذية المختلفة على كفاءة Bt من الصنف entomocidus ضد دودة ورق القطن (Boisduvalle ١٨٨٣) من رتبة حرشفية الاجنحة.

- ٢١١ جدول (٢٣-٤): تأثير الاملاح غير العضوية على كفاءة B.t. من الصنف entomocidus ضد دودة ورق القطن.
- ٢١٢ جدول (٢٤-٤): تأثير الاملاح غير العضوية على كفاءة بكتريا B.t. الصنف جاليري HD-234 ضد الدودة القارضة A.ypsilon
- ٢١٣ جدول (٢٥-٤): تأثير المركبات النتروجينية على كفاءة Bt من الصنف entomocidus ضد دودة ورق القطن.
- ٢١٣ جدول (٢٦-٤): تأثير الاحماض الامينية والاميدات على كفاءة Bt من الصنف جاليري HD-234 ضد الدودة القارضة.
- ٢١٤ جدول (٢٧-٤): تأثير المواد المذيبة للبروتين على كفاءة Bt من الصنف entomocidus ضد يرقات دودة ورق القطن.
- ٢٣٦ جدول (٢٨-٤): تحليل الاليزا للدلتا-اندوتوكسين في عينات Bt باستخدام الجسم المضاد وحيد الكلونة.
- ٢٩٨ جدول (١-٦): امثلة عن المكونات المحلية لبيئات الباسيلليس والمتوفرة في الدول النامية
- ٢٩٨ جدول (٢-٦): بعض امثلة المواد الخام التي تستخدم في تجهيز بيئة التخمر للانتاج المحلي للباسيلليس سفيركس B.T.I.
- ٣١٠ جدول (٣-٦): انتاج B.t.i. باستخدام نظام اعادة تدوير الخلايا
- ٣١٠ جدول (٤-٦): انتاج بكتريا باسيلليس سفيركس باستخدام نظام إعادة تدوير الخلايا
- ٣١١ جدول (٥-٦): معايير الحركة للباسيلليس ثورينجنسيز
- ٣١٢ جدول (٦-٦): مقارنة بين مزارع بكتريا Bt بطريقة batch والقطفة المغذاة.
- ٣١٣ جدول (٧-٦): زيادة الانتاج في خلال توسيع عملية التخمر لبكتريا Bt تحت OTR * ثابت
- ٣٢١ جدول (٨-٦): التغيرات في حموضة وكفاءة المزرعة مع الوقت خلال عملية التخمر (قطفة - ١) لبكتريا Bt جاليري HD-234 في وحدة التخمر المتحركة. معدل التهوية ٣م٨٥ / ساعة.
- ٣٢٢ جدول (٩-٦): تأثير استبعاد مصدر الكربون الحر على حموضة المزرعة والكثافة في تحوير FMI لبيئة الخميرة المغذية (تحضير رقم ٥٠). استخدام بكتريا Bt جاليري HD-234. الحموضة الابتدائية ضبطت على ٧,٤. الحجم الكلى للمزرعة كان ٣م١.
- ٣٢٣ جدول (١٠-٦): تأثير تركيز بعض تجهيزات الاندوتوكسينات ضد يرقات دودة ورق القطن
- ٣٢٥ جدول (١١-٦): تقدير فعالية مختلف تجهيزات الاندوتوكسين المحضر محليا في Bt كورستاكي HD-341 ضد العمر اليرقي الثاني من دودة ورق القطن.

- ٣٢٥ جدول (١٢-٦): تقدير LC_{50} لبعض مستحضرات اندوتوكسين الناتجة من وحدة التخمر المتحركة قبل وبعد تجهيز المستحضر ضد العمر الثاني ليرقات دودة ورق القطن.
- ٣٢٩ جدول (١٣-٦): مقارنة بين مرضية باسيليس ثورينجنسيس على مختلف سلالات بلوتيل زيلوستيلا المجموعة من مختلف اماكن تاوان
- ٣٣٠ جدول (١٤-٦): تأثير الحموضة على عنف وحيوية جراثيم Bt على حشرة DBM
- ٣٣٠ جدول (١٥-٦): ثبات بكتريا Bt على درجات الحرارة المختلفة
- ٣٣١ جدول (١٦-٦): تأثير مضاف Sinigrin على عنفوانية بكتريا Bt على حشرة DBM
- ٣٣١ جدول (١٧-٦): تأثير الكاتيونات على مرضية Bt لحشرة DBM
- ٣٣٢ جدول (١٨-٦): تأثير الجرعة تحت القاتلة على موت اليرقات وتطور حشرة DBM
- ٣٣٣ جدول (١٩-٦): اعداد يرقات DBM على القرنيط بعد الرش بمستحضرات مبيدات حشرية مختلفة (شاج هاور ١٩٨٧)
- ٣٣٨ جدول (٢٠-٦): قيم LC_{50} لعزلات Bt ضد العمر اليرقي الثالث لحشرة لافات الاوراق الخضراء اللوز.
- ٣٤٧ جدول (٢١-٦): انتاج النيوكليتيدات مع ٢ جم من الخلايا البكتيرية
- ٤٥٠ جدول (١-٨): المجاميع الأولية للاندوتوكسينات في الباسيليس ثورينجنسيس وتخصصها الابادي ضد الحشرات
- ٤٥٥ جدول (٢-٨): النباتات المهندسة وراثيا بجينات Bt المخلفة
- ٤٧٦ جدول (٣-٨): المحاصيل المهندسة وراثيا ببكتريا الباسيليس التي تمت الموافقة عليها بشكل كامل في الولايات المتحدة الأمريكية
- ٤٨١ جدول (٤-٨): المساحة المزروعة بالمحاصيل المهندسة وراثيا ببكتريا الباسيليس في امريكا (١٩٩٨ ، ١٩٩٩)
- ٤٨٢ جدول (٥-٨): خفض استخدام المبيدات الحشرية لمكافحة ديدان البراعم واللوز بعد ادخال القطن المحمي ببكتريا Bt (مقارنة استخدام المبيدات عام ١٩٩٥ مع استخدامات ١٩٩٨ *
- ٤٥٨ جدول (٦-٨): عدد معاملات المبيدات الحشرية في القطن لمكافحة ديدان براعم ولوز القطن قبل (١٩٩٥) وبعد (١٩٩٦-١٩٩٨) ادخال القطن البكتيري بالباسيليس Bt *
- ٤٨٥ جدول (٧-٨): النسبة المئوية لافات القطن الحشرية التي قتلت بواسطة القطن المهندس وراثيا ببكتريا Bt في القطع التجريبية.
- ٤٩١ جدول (٨-٨): تقييم سمية الباسيليس ثورينجنسيس على الثدييات - المبيدات الحشرية الميكروبية (التعرض عن طريق الفم)

| | |
|-----|--|
| ٤٩٢ | جدول (٨-٩): سمية الكراي بروتينات للباسيليس ثورينجينسيز علي الثدييات المعبر عنها في النباتات: حساب حدود التعرض الغذائي (NOEL) في دراسات الحيوانات/مستويات تعرض الانسان) |
| ٤٩٧ | جدول (٨-١٠): هضم كراي بروتينات بكتريا Bt خارج الكائن الحي في سائل معدة محاكي. |
| ٤٩٩ | جدول (٨-١١): مقارنة الخصائص البيوكيميائية للكراي بروتينات والعلاقة المختارة والبروتينات المعروف عنها احداث الحساسية Allergenic proteins |
| ٥٠٠ | جدول (٨-١٢): القائمة الموصي بها للمواد المغذية الفاتحة ومضادات التغذية لوضع التكافؤ الكبير في المحاصيل الموضحة. |
| ٥٠٢ | جدول (٨-١٣): سمية الكراي بروتينات للكائنات غير المستهدفة. |
| ٥١٠ | جدول (٨-١٤): ملخص للتجارب الحقلية التي تمت الموافقة عليها عام ١٩٩٢ في كندا |
| ٥٤٥ | جدول (٩-١): المركبات الحيوية المسجلة وتحت التسجيل في مصر حتى عام ٢٠٠٢ |
| ٥٥٢ | جدول (٩-٢): عدد المتربين والكميات المنتجة من الفيروس والبكتريا والفرمونات الجاذبة الجنسية لفرشة درنات البطاطس المنتجة واستخداماتها خلال موسم ٢٠٠١ |
| ٥٥٢ | جدول (٩-٣): المركبات الحيوية التي تم انتاجها بوحدة انتاج المبيدات الحيوية - معهد بحوث وقاية النباتات. |
| ٥٥٥ | جدول (٩-٤): المركبات الحيوية المستخدمة في مكافحة الافات والمنتجة في مصر |
| ٥٥٦ | جدول (٩-٥): الافات الرئيسية التي تستهدفها مكافحة الحيوية |
| ٥٥٦ | جدول (٩-٦): استخدام المركبات الميكروبية لمكافحة الافات في مصر |

مقدمة الكتاب

* تعاضم الأعلان والأشادة بكفاءة وفاعلية مستحضرات بكتريا "باسيلليس ثورينجينسيز" في مكافحة يرقات حشرات حرشفية الأجنحة خاصة دودة ورق القطن وغيرها في السنوات الأخيرة. كذلك بعض السلالات ودورها الفعال في القضاء والسيطرة على يرقات البعوض. كنت أتعجب وغيرى من الأساتذة الأفاضل العاملين في مجال مكافحة الآفات واتساءل ماذا يمكن أن تحقّقه هذه المستحضرات الحيوية في ظل تواجد أعداد كبيرة من الآفات حيث أن هناك قناعة واتفاق بأن الاتجاهات والأساليب الحديثة في مكافحة تعمل بكفاءة في ظل تعداد منخفض من الآفات وفي حالة وجود أعداد كبيرة لابد من التدخل بالمبيدات لخفض التعداد ثم الوسيلة الحديثة مما يحقق مكافحة جيدة.

* لقد زادت حرارة الأعلان والترويج لهذه المستحضرات البكتيرية عندما نجح معهد بحوث الهندسة الزراعية التابع لمركز البحوث الزراعية بوزارة الزراعة في الحصول على سلالة فعالة من هذه البكتيريا ثم اختبارها وتسجيلها وتداولها تحت الاسم التجاري "أجرين". كانت حرارة الترويج تهلّل بأن هذا المستحضر شديد الفاعلية على بيض دودة ورق القطن وكان هذا مخالف بشكل ما هو معروف عن كيفية أحداث الفعل لهذه البكتيريا والسموم الداخلية والخارجية التي تفرزها. لقد كان الإستغراب حول إحداث فاعلية وقتل فوري للبيض المعامل ولا تفسير ولا دليل ولا حاجة مقنعة. لذلك أثرت أن أتاول هذا الموضوع بحياد تام وموضوعية ونظرة علمية بحثه لإلقاء الضوء عن هذه البكتيريا ومستحضراتها مآلها ومآليها. لقد تناولت في هذا الكتاب تسعة أبواب أشتملت على الموضوعات التالية:-

- ماهى بكتريا باسيلليس ثورينجينسيز:
الخصائص - الوجود الطبيعي - الإنتاج
- تأثيرات بكتريا الباسيلليس على الحشرات والميكروبات واللافقاريات والفقاريات غير المستهدفة في البيئة.
- العوامل البيئية وعلاقتها بثبات وسمية ونقل وانتشار بكتريا الباسيلليس في المستحضرات الحيوية لمكافحة الآفات.
- المبيد الحيوى باسيلليس ثورينجينسيز واستخداماته في الدول النامية.
- مختبرات فسي الدراسات التي أجريت في المعاهد البحثية والجامعات المصرية عن فاعلية وأداء سموم وأحداث الفعل في بكتريا باسيلليس ثورانجينسيز.
- التحديات التي تواجه الإنتاج والاستخدامات الخاصة بالباسيلليس ثورينجينسيز في الدول النامية.
- إدارة المقاومة لتوكسينات باسيلليس ثورينجينسيز.
- النباتات المهندسة وراثيا بجينات توكسينات بكتريا الباسيلليس ثورينجينسيز Bt (النقدم والمنظور).
- إنتاج المبيدات الحيوية البكتيرية والفيروسية في معهد بحوث وقاية النباتات - مركز البحوث الزراعية - مصر.
- أرجو أن يوفقنى الله سبحانه وتعالى في هذا الاتجاه وعلى الله قصد السبيل خدمة للزملاء وأبنائى الطلبة العاملين في مجال الإدارة المتكاملة للآفات في مصر والوطن العربى الكبير.

أ.د. زيدان هندی عبد الحميد

بسم الله الرحمن الرحيم

الباب الأول

ماهية بكتريا باسيلليس ثورنيجينسيس

الخصائص - الوجود الطبيعي - الإنتاج

مقدمة: باسيلليس ثورنيجينسيس (B.t.) بكتريا ساحرة تنتج عدد من التوكسينات التي تبيد الحشرات كما أنها تبدو كمصنع وصناعة كاملة. لقد بدأ الإنتاج التجارى لبكتريا B.t. منذ مايزيد عن ٦٠ عاما ولسنوات عديدة كانت تعتبر مبيد حيوى آمن "Safe biopesticide" ذات سمية محدودة للقليل من حشرات حرشفية الأجنحة مع عدم وجود مايدل أو يشير الى تأثيرات ضارة على الثدييات أو الكائنات غير المستهدفة. من الملفت للنظر أن المعلومات عن هذه البكتريا تقدمت وتطورت بسرعة كبيرة لدرجة أنه كان وما زال يتم تعريف سلالات جديدة وتوكسينات جديدة كل عام لدرجة أنه قد تولد إحساس بالعجز والغموض عن كنهه وكيئونه وماهية ومكونات وآفاق بكتريا الباسيلليس. مع نجاح عزل سلالات جديدة من البكتريا B.t. يتم الكشف عن أنشطة وفاعلية ضد مدى واسع من الكائنات الحية على خلاف ماكان يعتقد الكثرين من أن B.t. ذات الأمان العالى متخصصة فقط على حشرات حرشفية الأجنحة. جينات توكسينات B.t. تدخل ويعبر عنها فى كائنات أخرى وقد أدت التطورات السريعة فى عملية الهندسة الوراثية ونقل الجينات Transgenics الى تغيرات فى المفاهيم العامة والعلمية عن المخاطر والأمان. بالرغم من تعاطف وجود مجاميع كبيرة من العلماء والتطبيقيين تنادى بأحلال البكتريا B.t. محل المبيدات الا أنه فى الوقت الراهن تسود أقترحات بضرورة إعادة التأكد من أمان مستحضرات هذه البكتريا بسبب عدم توفر كفاية فى تقارير السمية على الثدييات حيث أن مايعنينا فى مكافحة الآفات هو التوكسينات الناتجة من البكتريا.

من الأصدار المثير ذلك الذى نشره Dixon ١٩٩٤ تحت عنوان مثير "ضع عينيك على الباسيلليس ثورنيجينسيس" وهو يعطى دليل ومؤشر عن المناخ الجارى والاحتياجات والحذر المحيط باستخدام المبيدات من الناحيتين الحيوية والكيميائية. فى هذا الأصدار المنشور فى مجلة البيوتكنولوجى صرح ديكسون بأن B.t. مبيد حيوى آمن ولكنه نادى بضرورة الاستكشاف عن قرب للتأثيرات الصحية السالبة. لقد أشار كذلك الى دور

باسيليس سيريس والباسيليس غير المرضية في حدوث مرضية للإنسان حتى لو كانت هناك مجرد فرصة لحدوث المرضية. لقد أشار أيضا الى توفر العديد من الدراسات المرجعية عن السمية على الثدييات أثارت العديد من الأسئلة حول أمان B.t. مع زيادة اهتمام العامة بأمان B.t. وعزل سلالات جديدة والكشف عن توكسينات جديدة مع عدم وضوح التمييز بين B.t. والنوع القريب منه *B. cereus* حتمت ضرورة مراجعة أمان B.t. في هذا المقام سوف نحاول القاء الضوء عن الأمان البيئي على الثدييات والكائنات غير المستهدفة من B.t. من خلال الاستعراض الوافي للنواحي البيئية والبيولوجية. لقد كان الهدف الرئيسى فى هذا التناول الوقوف على أمان الدلتا. أندوتوكسينات الفعالة على اللافقاريات ولو أن هذا مستحيل تحقيقه وتحديد أمان المركبات الناتجة ومستحضرات B.t. دون الأخذ فى الاعتبار مدى التوكسينات التى تنتج بواسطة السلالات المختلفة من البكتيريا. صور بكتيريا B.t. تمثل أساس مايزيد عن ٩٠% من كل المبيدات الحيوية التى تباع فى الأسواق على مستوى العالم. معظم المركبات خاصة تلك التى تباع فى أسواق الدول المتقدمة مثل أمريكا وأوربا لا تحتوى على البيتاأكسوتوكسين للـ B.t. وذلك بسبب سهولة تسجيل مستحضرات الـ B.t. الخالية من التوكسينات الخارجية والتى أثبتت الدراسات التوكسيكولوجية أنها تحدث تأثيرات صحية خطيرة مثل السرطان على الإنسان.

لذلك سوف نركز على أمان الدلتا - أندوتوكسينات خاصة فى نواحي التأثيرات البيئية لخلايا أو جراثيم B.t. والتوكسينات التى تنفرد وتتحرر من هذه الخلايا كذلك تشير الى استخدام أمان B.t. المتحولة وراثيا ودورها فى مكافحة الآفات علاوة على الأمان البيئي.

لقد تم استعراض كم كبير من الأصدارات والنشرات عن B.t. والأمان الخاص بها خلال ٦٠ عاما أو يزيد منذ بداية دخول هذه الوسيلة الحيوية الى النطاق التجارى كمبيد لمكافحة الآفات. لقد استخدمت B.t. مباشرة فوق المدن ... هل يتصور أحد أيا كان إمكانية السماح بفعل نفس الشئ مع المبيدات مهما كانت درجة الأمان. تجدر ملاحظة أن غالبية الدراسات التى أجريت على B.t. أكثر تخصصا مما هو الحال مع المبيدات الخسرية التقليدية مع سمية منخفضة على الثدييات. هناك نقاط مازالت فى حاجة لمزيد من الدراسة مثل العلاقة بين B.t. و *B. cereus* خاصة من حيث الأمان لقد قام مؤلفو كتاب "Bacillus thuringiensis: Biology Ecology and safety" وهما Travis R. و Glare and Maureen o'callaghan والمنشور بواسطة دار النشر الشهيرة فى إنجلترا

وأمریکا وکنڈا "John wiley & sons, Ltd" بفحص ومراجعة مايزيد عن ٨٠٠ ملخص وأصدار ونشرات وتقارير غير منشورة. هذا الكم الهائل ليس بالكثير بسبب ضخامة البحوث والدراسات والمشروعات التطبيقية التي شملت B.t. في العديد من دول العالم كما أن بعض البيانات غير متوفرة كذلك. بالإضافة الى ذلك فإنه بسبب الأهمية التجارية لمستحضرات B.t. تجرى العديد من البحوث الحديثة عن سمية مجاميع جديدة من الكائنات الحية وجينات توكسينية جديدة ومازالت نتائجها دون نشر أو إعلان.

باسيلليس ثورنيجنيسيز B.t. بكتريا مكونة للجراثيم قادرة على إنتاج عدد من السموم أو التوكسينات بما فيها الأندوتوكسينات كمبيدات حشرية والتوكسينات الخارجية وليسينات الدم والتوكسينات المعدية. مستوى التنوع بين العزلات داخل النوع عالى حيث أمكن تمييز ٦٠ طرز سير ولوجى ومايزيد عن ١٧٠ جين يشفر الأندوتوكسينات. حساسية العديد من الحشرات لمختلف أنواع التوكسينات أدت الى استخدام B.t. كمبيدات حيوية. مستحضرات B.t. تمثل أساس مايزيد عن ٩٠% من المبيدات الحيوية الموجودة تجاريا كما سبق القول. سوف نلقى ونركز على توضيح بيولوجية وأيكولوجية B.t. وكذلك الأمان البيئى وعلى التدبيات والكائنات غير المستهدفة للتوكسينات الداخلية المستخدمة كمبيدات حشرية والتي تنتج بواسطة B.t. سوف نحاول القاء الضوء عن التأثيرات الضارة لتطبيقات B.t. لقد تم عزل باسيلليس ثورنيجنيسيز لأول مرة عام ١٩٠١ فى اليابان ولكنها أخذت الاسم بعد الكشف الأخير عن البكتيريا التي تقتل فراشات الدقيق فى ثورنجا بألمانيا. لقد ظهرت فاعلية B.t. كوسيلة مكافحة ضد الحشرات ببطئ حيث أمكن إدخال أول مركب لهذا الغرض فى فرنسا عام ١٩٣٨ ولم تظهر أية اهتمامات فى معظم الدول الأخرى بهذا الوافد الجديد القديم حتى نهاية الخمسينات. لم تتأكد الرابطة بين السمية وجسم الجراثيم حتى الخمسينات. الآن تشير التقديرات والأحصائيات الى وجود مايزيد عن ٦٠ ألف عزلة من B.t. فى مجموعات عامة وخاصة على امتداد العالم بما فيها الاهتمام باستخدامات هذه البكتريا المتميزة.

ماهى الباسيلليس ثورنيجنيسيز (B.t.):

هذا هو السؤال الذى شغل فكر الكثير من الباحثين الذين يعملون على هذا النوع المميز والمثير من البكتيريا B.t. بكتريا مكونة للجراثيم ولها فعل إيادى على الحشرات وأحيانا تكون لها تأثيرات سامة عريضة. النوع B.t. يتضمن عدد ضخم من السلالات شديدة التنوع ذات صور عريضة الاختلاف من التوكسينات ومن ثم أنشطة واسعة ضد

مدى كبير فى الحشرات وبعض الكائنات الأخرى. لقد تعرضت B.t. لدراسات واسعة عن دورها فى البيئة منذ البداية وباستمرار حتى تطويرها كمبيد حيوى متميز فى نهاية القرن العشرين. B.t. تنتج عدد من التوكسينات الأبادية ضد الحشرات فى صورة بلورات بروتينية دون أن تكون هى نفسها عالية الفاعلية كممرض للحشرات. هذا النوع به عدد من تحت الأنواع المميزة والأصناف والطرز والأنواع المرضية. يوجد مايزيد عن ١٧٠ إندوتوكسين - جينات التشفير ومعظمها فعالة ضد الكائنات الحية ولكنها مقسمة فى قليل من الرتب يمكن التعبير عن كل منها من ١- عديد من بين ٨٢ طرز سييرولوجى (جدول ١-١). بالإضافة الى ذلك فإن B.t. تستطيع إنتاج توكسينات أخرى مثل التوكسينات الخارجية exotoxins والهيموليسينات haemolysins والأنثروتوكسينات entjerotoxins وجميعها لها تأثيرات أبادية على الحشرات وكذلك سمية على الثدييات. يصعب فصل B.t. عن *Bacillus cereus* من الناحية الوراثية والتي لها تحفظات خاصة بالأمان حيث أن بعض سلالات *B. cereus* تنتج توكسينات تسبب التهاب الأمعاء والمعدة gastroenteritis فى الإنسان.

التعقيد الناتج من اندماج ووجود خليط من البروتينات الأبادية على الحشرات والتي يعبر عنها فى السلالات والتي تعرف من خلال الطرق العديدة البيوكيميائية والوراثية والسيرولوجية وتجهيزها فى صورة سلاسل من المستحضرات خلال دول العالم جعلت من الألبام بكل ماهو مرجعى مثل الـ B.t. من الأمور الصعبة. استخدام الأسم باسيلليس ثورنيجينسز لايعطى أى دليل عن نوع التوكسينات أو الخلايا أو الجراثيم أو البلورات أو المستحضرات التى استخدمت فى أى دراسة. لذلك تكونت قناعة لدى مؤلفى هذا الكتاب أن B.t. ماهى إلا تجميع لعزلات فردية وأن المستحضرات المتوفرة فى الوقت الراهن لاتحتوى على جراثيم وبلورات B.t. فقط وإنما تحتوى كذلك على مواد قد تؤثر على السمية. ليكن معلوما أن توصيف الـ B.t. ليس علم على وجه الدقة وأنه فى العديد من الحالات لايمكن أرجاع السمية الخاصة لأى شئ وإنما لتحت نوع أو منتج ما.

التسمية Nomenclature :

لقد أصبح موضوع مناقشة ماهية بكتريا B.t. من الأمور الصعبة بسبب السلاسل الطويلة من الأسماء والعديد من التغييرات في التسمية كما هو وارد في الدراسات المرجعية. لقد تم تعريف السلالات (الخلايا الكلية) بوسائل متعددة ومختلفة ولكن الطريقة الأكثر شيوعاً هي الطريقة السيرولوجية Serotyping بواسطة الأنـتـيجينات - H تحت المجاميع مثل الطرز السيرولوجية ثم تقسيمها في الأصل كاصناف Varieties بينما وضع كود تسمية للبكتريا يتطلب تمييز تحت المجاميع هذه كتحت أنواع (Sneath) Isubspecies وآخرون ، ١٩٨٦). لذلك فإن ما أطلق عليه قبل B. thuringiensis var. kurstaki أصبح يعرف الآن B. thuringiensis kurstaki . لقد تم إعادة تقييم جينات التوكسينات مرات عديدة على أنها جينات فردية كما تم تعريف البروتينات السامة. في البداية كانت تتبع نظم عشوائية لتسمية كل توكسين بواسطة كل مكتشف. في عام ١٩٨٩ قدم Hofte and whiteley أول تقسيم تصنيفي وتسمية لبروتينات التوكسينات بناء على نشاطها في إبادة الحشرات. بعد ذلك ظهرت استثناءات في التقسيم بسبب تعريف جينات أكثر ذات فعل أبادي على الحشرات. لقد اقترح Crickmore وآخرون (١٩٨٨) نظام جديد للتسمية مبنية على استخدام عنقود هرمي من تتابع الأحماض الأمينية المعروفة. هذا النظام استبدل الأرقام الرومانية بالأرقام العربية في المرتبة الأولى (مثل Cry 1 Aa) وحتى استخدام أرقام أكبر مع التتابعات الجديدة المتوقعة (سوف نضع نموذجاً للتسمية في هذا الكتاب إن شاء الله). مرة أخرى نؤكد أن الدلتا-أنتوتوكسين ليس التوكسينات الوحيدة التي تنتج بواسطة سلالات B.t. وتحت النوع. سوف نشر في هذا الصدد إلى الأنتوتوكسينات خاصة البيتا-أنتوتوكسين بالرغم من أنه تم وصف أكثر من نوع واحد. في النهاية فإن دور الجراثيم والبلورات السامة وغيرها من التوكسينات التي تتدخل أو تعمل باستقلالية لم تعرف جيداً في الدراسات ومن ثم فإن الاسم B.t. قد يعني أي خليط إذا لم يعلن.

نظرة تاريخية: لقد تم وصف B.t. لأول مرة بواسطة Berliner (١٩١١) عندما قام بعزل الباسيليليس من فراشة دقيق البحر المتوسط وقد أطلق عليه بعد ذلك اسم مقاطعة Thuriungia في ألمانيا حيث وجدت في الدقيق المصاب هناك. بالرغم من أنه كان الوصف الأول تحت الاسم ب. ثورنجيسيتز إلا أنها لم تكن العزلة الأولى. في عام ١٩٠١ قام البيولوجي الياباني S.Ishiwata بعزل البكتريا كمسبب للمرض في ديدان الحرير

وهو مرض سوتو "Sotto disease" (باسيلليس يحدث الهمم الفجائي) . فى عام ١٩٠٨ أطلق الباحث إيشيوانا الاسم بكتريا الباسيلليس سوتو إيشيوانا وبعد ذلك اتفق على أن الاسم غير صالح وتم التعديل الى باسيلليس ثورينجيسينز. فى الأصل اعتبرت B.t. ذات مخاطر على ديدان الحرير ومررت عدة حقبة تاريخية قبل أن تبدأ البحوث فى استخدام البكتريا B.t. فى مكافحة الحشرات. فى عام ١٩٢٨ بدأت بحوث مكافحة ثاقبة الذرة (أوسترينيا نوبيلاليس) وأجريت أول معاملة ميدانية بواسطة Husz (١٩٢٩) ضد هذه الآفة. لقد بدأ أول إنتاج تجارى فى فرنسا عام ١٩٣٨ تحت الاسم "سبورين Sporeine" (لامبرت وبينروين ١٩٩٢). بعد ذلك ولأسباب مختلفة قل الاهتمام فى العقود الزمنية التالية ثم عاد الاهتمام بال B.t. بعد ذلك عن طريق الباحث إوارو ستيهاوس "أب فسيولوجيا الحشرات" والذي حصل على مزرعة عام ١٩٤٢ وأثار الانتباه الى فاعلية B.t. من خلال دراساته اللاحقة (تاناكا وكايا، ١٩٩٣).

لقد اتضح وظهر وجود جسم جرثومى خارجى فى خلايا B.t. المتجرثمة فى بداية ١٩١٠ بواسطة Berliner وبعدها بوقت طويل تم تعريف بعض مواصفات الجرثومة الخارجية تحت الظروف القلوية وليس الظروف الحامضية (Hannay و ١٩٥٣). فى عام ١٩٥٥ أثار هاناى وفيتز-جيمس الى الطبيعة البروتينية للبلورة كما أثار Angus (١٩٥٤)، (١٩٥٦) أن بلورة الجرثومة الخارجية كانت سبب السمية على ديدان الحرير. لقد حدث فicus من البحوث على البروتينات البلورية للـ B.t. مع دراسة تركيب البلورة والكيمياء الحيوية وكيفية أحداث الفعل خلال العشرين سنة التالية (فان فرانكلينهورين ، ١٩٨٣). لقد عضدت ودعمت بحوث وتطوير بكتريا B.t. بواسطة دلماج وبيجل فى وزارة الزراعة الأمريكية والذين قاما بتجميع كل السلالات الأولى. قام دلماج بعزل سلالة HD-1 والتي تستخدم كسلالة قياسية فى دراسات B.t. بعد ذلك ومازالت تستخدم فى عديد من المنتجات حتى اليوم.

لقد حدث أول استخدام تجارى للـ B.t. فى أمريكا عام ١٩٥٨. خلال الستينيات تم تطوير العديد من المستحضرات للتجريب وحقق البعض منها نجاحات. لقد تم تسويق والأتجار بمركب ثوريسيد Thuricide والذي يعتمد على B.t.kurstaki مع B.t.thuringiensis عام ١٩٥٧ كما قامت معامل أبوت بنشر مركب الدايبيل B.t.kurstaki, Dipel عام ١٩٧٠. لقد حدث أول تسجيل للـ B.t. فى وكالة حماية البيئة الأمريكية US-EPA عام ١٩٦١ (Starnes وأخرون ، ١٩٩٣). فى السبعينات ساد

الأعتقاد بأن B.t. فعالة فقط ضد حشرات حرشفية الأجنحة. بعد ذلك توالت أكتشافات B.t. israelensis الفعالة ضد البعوض والذباب الأسود ثم القيام بعزل B.t. tenebrionis عام ١٩٨٣ الفعالة ضد بعض حشرات غمدية الأجنحة مما يلقي الضوء على النشاط الواسع لمستحضرات B.t. فى الواقع والحقيقة فإن كل سلالة جديدة أظهرت مستوى معين من التخصص مما أدى الى الاقتراح بأن B.t. تعتبر نموذجية للسيطرة المتكاملة على الآفات IPM وكذلك الاستخدامات البيئية الحساسة والتي لا ينصح باستخدام المبيدات التقليدية فيها.

لقد استمر ومازال البحث عن سلالات B.t. جديدة ومع تقدم فهم وراثته أنتاج البروتين السام ثم الكشف عن توكسينات B.t. غير عادية. فى عام ١٩٩٢ قام لامبرت وبيفريون بتقدير أن مايقرب من ٤٠ ألف عزلة B.t. موجودة فى عينات مجمعه على مستوى العالم ولو أن الباحثان بوسياس وبندلاند (١٩٩٨) قدروا العزلات بحوالى ٦٠ ألف. بالإضافة الى السلالات للفعالة ضد حشرات حرشفية الأجنحة وثنائية الأجنحة وغمدية الأجنحة تم اكتشاف سلالات فعالة ونشطة ضد غشائية الأجنحة ونصفية الأجنحة والنيماتودا والبروتوزوا (Rajamohan وآخرون، ١٩٩٨). لقد استمرت الزيادة واضطراد الكشف عن سلالات B.t. والتوكسينات الأبادية ضد الحشرات بمعدل مذهل. لقد أشار لامبرت وبيفريون (١٩٩٢) أننتاج أكثر من ٢٥ بروتينات بلورية مختلفة ولكنها مرتبطة معا بواسطة بكتريا B.t. بينما آخر قائمة موجودة على الأنترنت خاصة بتوكسينات B.t. (Crickmore وآخرون، ١٩٩٩) لحوالى ١٢٠ جينات cry و cyt أساسا من بكتريا B.t. فى عام ١٩٩٨ أشار Rajamohan وآخرون الى وجود ٥٨ طرز سيروولوجى مميزة بينما أوضح آخر إصدار الى تعريف ٦٩ طرز سيروولوجى مع ١٣ مجموعة أنتيجنية أى بمجموع ٨٢ صنف سيروولوجى (جدول ١-٢).

الاستخدام التجارى لبكتريا Commercial use of B.t.

إستخدام منتجات B.t. مستحضرات B.t. من أكثر المبيدات الحيوية إستخداما على مستوى العالم حيث تبلغ المبيعات التجارية مايزيد عن ٩٠%. فى عام ١٩٩٠ فإن مبيعات منتجات B.t. بلغت ١١٠ مليون دولار من إجمالى السوق للمبيدات الحيوية البالغ ١٢٠ مليون دولار (Powell and Jutsum، ١٩٩٣). يوجد مدى واسع من المنتجات متاح ضد الآفات المختلفة حيث تم تسجيل مايزيد عن ١٠٠ منتج تعتمد على عشرة طرز

سيرولوجية (جدول ١-٣). تستخدم *B.t. kurstaki* بشكل متكرر في المنتجات التجارية بعض منها مازال يعتمد على سلالة HD-1 من مجموعة دلماج. لقد استخدم *B.t.* في مكافحة عدد من آفات الغابات وحيث أنها تتطلب في العادة تطبيق الرش الجوي أو النشر يعتبر *B.t.* هو المبيد المناسب ليحل محل الكيمائيات التقليدية بسبب التأثيرات على الصحة والأحياء غير المستهدفة. لقد استخدم *B.t. Kurstaki* في مكافحة الفراشة العجيرية (اليمنتاريا ديسبار) ودودة البراعم (كوريسينيورا فوميفيرانا) في أمريكا الشمالية. خلال الفترة من ١٩٨٠ - ١٩٩٥ أشار بيردون ووانجر (١٩٩٥) أن ما يقارب ١٧ مليون هكتار عولمت ببيكتريا كوريستاكي في شرق أمريكا كجزء من حملة وبرامج خفض تعداد الفراشة العجيرية. لقد أدى الرش الجوي للـ *B.t.* في ١٩٩٠ - ١٩٩٥ إلى استئصال الفراشة العجيرية في جبال Wasatch في يوتا بأمريكا. لقد تم رش ما يقرب من ٢٥٠ ألف هكتار في الفترة ١٩٨٥ - ١٩٩٤. ببيكتريا *B.t. Kurstaki* لمكافحة الفراشة العجيرية. *B.t.* واحدة من قليل من المبيدات المسجلة التي تستخدم على نطاق واسع بالرش الجوي في كندا.

بيكتريا *B.t.* كورستاكي يباع على نطاق واسع في مكافحة آفات المحاصيل الحقلية والبستانية. كمثال استخدمت هذه البيكتريا في أستراليا في صورة منتجات متنوعة ضد مدى عريض من حشرات حرشفية الأجنحة على القطن (*Helicoverpa spp.*) وفراشة الكرنب وأبو النعيق الأبيض على زراعات الخضر وبعض حشرات الفاكهة ونباتات الزينة وبعض الآفات الحشرية على ثمار الكيوي والفراولة والدخان. لقد بلغ حجم سوق *B.t.* في أستراليا ما يكفي لمعاملة ١٠٠ ألف هكتار تمثل حوالي ٥% من السوق الكلي لمبيدات القطن وكذلك ١% من المحاصيل البستانية (١٠-٢٠ ألف هكتار). لقد بيعت السلالة *B.t. israelensis* تجاريا على نطاق واسع في مكافحة البعوض والذباب الأسود. هناك عدد من المنتجات الناجحة مثل تكنار وفيكتوباك. لقد استخدمت السلالة الإسرائيلية على نطاق واسع في حملة مكافحة البعوض والذباب العاص في أمريكا وألمانيا وفي أفريقيا ضد الناقلات من عائلة *Simuliidae* التي تنقل مسببات داء المسببات الملتحية. لقد استخدم عدد من مستحضرات *B.t.* في الاتحاد السوفيتي سابقا ضمن المبيدات الحيوية ومنها *B.t. caucasicus* ضد الفراشة العجيرية والأنواع المرتبطة بها ومستحضرات Bitoksibatsillin ضد خنفساء كلورادو البطاطس (*Enterobaktering B.t.gallariae*) ضد ما يزيد عن ٥٠ نوع من الحشرات. في روسيا كانت تعامل، مليون هكتار سنويا في

بداية التسعينيات بمستحضرات دندروباسيللين (٨٤٠ ألف هكتار) وبيتواكسيباسيللين (٨٢٠ ألف هكتار). لقد استخدم *B.t. tenebrionis* في مكافحة خنفساء كلورادو البطاطس في أمريكا وغيرها. *B.t.* غالبا ما تستخدم في نظم IPM لأن التخصص العالي للمستحضرات مما يقلل لحد كبير من التأثيرات على الكائنات غير المستهدفة خاصة الأعداء الطبيعية للآفات الحشرية. في نيوزيلندا تم إدخال نظام IPM في إنتاج ثمار الكيوى يسمى "Kiwigreen" بإدخال *Kurstaki B.t.* والزيت المعدني مع استكشاف مشاكل الآفات خاصة الحشرات القشرية المسلحة ولافات الأوراق (Steven وآخرون ، ١٩٩٧).

المعاملة بالنثر فوق الأماكن الحضرية المأهولة بالسكان:

من أكثر الاستخدامات المستمرة للـ *B.t.* المعاملة بالنثر فوق الأماكن المدنية المأهولة بالسكان وعلى وجه العموم في حملات استئصال الآفات الغازية بعد الكشف عنها. هناك ثلاثة أمثلة تتمثل في استئصال الفراشة العجورية الآسيوية في فانكوفر (١٩٨٨) وفي شمال كارولينا (١٩٩٣) واستئصال فراشة ناسوك ذات البقع البيضاء *Orgyia thyellina* في أركلاندونيوزيلندا (operation Evergreen، ١٩٩٦). في هذه الأمثلة الثلاثة تم تنظيم استخدام *B.t. Kurstaki* كبديل آمن للمبيدات الحشرية الكيميائية والتي كانت فعالة بما فيه الكفاية لتحقيق الاستئصال. اهتمام العامة بالأمان أدى إلى ضرورة القيام باستكشاف بعد الرش على مجموع الناس المعرضون للـ *B.t.* في Brunswick بكندا استخدمت المبيدات لمكافحة آفة الغابات *Choristoneura fumifera* مع ترك مناطق فاصلة بما يسمح بالرش الجوي بالإنجراف للمبيدات المختلفة. بكتريا *B.t. Kurstaki* يجب أن ترش خلال ١٥٥ متر من أماكن سكنى الناس بالمقارنة بمسافة ٣٠٠ متر في حالة المبيدات الكيميائية. في برامج الاستئصال يتم التعرض المباشر للسكان في كل مرة رش. سوف نشير إلى التأثيرات الصحية للرش الجوي على تعداد السكان في مواضع أخرى من هذا الكتاب.

جدول (١-١): تقسيم باسيليس ثورينجيسيز تبعا للطرز الوراثي H-serotype

| H- Serotype | Serovar | First mention and first valid description |
|-------------|--------------------|---|
| 1 | Thuringiensis | Berliner 1915; Heimpel & Angus 1958 |
| 2 | Finitimus | Heimpel & Angus 1958 |
| 3a3c | Alesti | Toumanoff & vago 1951; Heimpel & Angus 1958 |
| 3a3b3c | Kurstaki | De Barjac & lemille 1970 |
| 3a3d | Sumiyoshiensis | Ohba & Aizawa 1989b |
| 3a3d3e | Fukuokaensis | Ohba & Aizawa 1989b |
| 4a4b | Sotto(dendrolimus) | Lshawata 1901; Heimpel & Angus 1958 |
| 4a4c | Kenya | Bonnefoi & de barjac 1963 |
| 5a5b | Galeriae | Shvetsova 1959 ^d ; de Barjac & Bonnefoi 1962 |
| 5a5c | Canadensis | De barjac & Bonnefoi 1972 |
| 6 | Entomocidus | Heimpel & Angus 1958 |
| 7 | Ai = awai | Bonnefoi & de Barjac 1963 |
| 8a8b | Morrisoni | Bonnefoi & de Barjac 1963 |
| 8a8c | Ostrinae | Ren et al. 1975 |
| 8b8d | Nigeriensis | Weiser & prasertphon 1984 |
| 9 | Tolworthi | Norris 1964; de Barjac & Bonnefoi 1968 |
| 10a10b | Darmstadiensis | Krieg et al. 1968 |
| 10a10c | Londrino | Arantes unpubl |
| 11a11b | Toumanoffi | Krieg 1969 |
| 11a11c | Kyushuensis | Ohba & Aizawa 1979b |
| 12 | Thompsoni | De Barjac & Thompson 1970 |
| 13 | Pakistani | De Barjac et al. 1977 |
| 14 | Israelensis | De Barjac 1978 |
| 15 | Dakota | Delucca et al 1979 |
| 16 | Indiana | Delucca et al 1979 |
| 17 | Tohokuensis | Ohba et al 1981a |
| 18a18b | Kumanotoensis | Ohba et al 1981b |
| 18a18c | Yasoo | Lee et al 1995a |
| 19 | Tochigiensis | Ohba et al 1981a |
| 20a20b | Yunnanensis | Wan-yu et al 1979 ^d |
| 20a20c | Pondicheriensis | Rajagopalan et al unpubl |
| 21 | Colmeri | Delucca et al 1984 |
| 22 | Shandongiensis | Wang ying et al 1986d |
| 23 | Japonesis | Ohba & Aizawa 1986a |
| 24a24b | Neoleonensis | Rodriguez-padilla & Galan-wong unpubl |
| 24a24c | Novosibirsk | Seleena et al 1995 |
| 25 | Coreanensis | Lee et al 1994 |
| 26 | Sito | De barjac & lecader unpubl |
| 27 | Mexicanensis | Rodriguez-padilla & galan-wong unpubl |
| 28a28b | Monterrey | Rodriguez-padilla et al unpubl |
| 28a28c | Jegathesan | Seleena et al 1995 |
| 29 | Amagiensis | Ohba unpubl |
| 30 | Medellin | Orduz et al 1992 |
| 31 | Toguchini | Hodirev unpubl |

| | | |
|----|-----------------|--|
| 32 | Cameroun | Jacquemard 1990 ^d juarez-perez et al 1994 |
| 33 | Leesis | Lee et al 1994 |
| 34 | Konkukian | Lee et al 1994 |
| 35 | Seoulensis | Lee et al 1995 ^a |
| 36 | Malaysiensis | Ho unpubl |
| 37 | Andaluciensis | Aldchis et al 1996 |
| 38 | Oswaldocrus | Rabinovitch et al 1995 |
| 39 | Brasihensis | Rabinovitch et al 1995 |
| 40 | Hua = hongensis | Dia jingyuan al 1996 |
| 41 | Sonncheon | Lee et al 1995a |
| 42 | Jighongiensi | Li rong sen et al in press |
| 43 | Guiyaniensis | Li rong sen et al in press |
| 44 | Higo | Ohba et al 1995 |
| 45 | Roskildiensis | Hinrinschen et al unpubl |
| 46 | Chanpaisis | Chanpaisaeng unpubl |
| 47 | Wratislaviensis | Lonc et al 1997 |
| 48 | Balearica | Caballero et al unpubl |
| 49 | Muju | Seung Hwan park et al unpubl |
| 50 | Navarrensis | Caballero et al unpubl |
| 51 | Xiaguangiensi | Jain pin yan unpubl |
| 52 | Kim | Kim et al unpubl |
| 53 | Asturiensis | Aldebis et al 1996 |
| 54 | Poloniensis | Damgaard et al unpubl |
| 55 | Palmanyolensis | Santiago-alvarez unpubl |
| 56 | Rongseni | Li rong sen in press |
| 57 | Pirenaica | Caballero et al unpubl |
| 58 | Argentinensis | Campos-dias et al unpubl |
| 59 | Iberica | Caballero et al unpubl |
| 60 | Pingluonsis | Li rong sen in press |
| 61 | Sylvestriensis | Damgaard unpubl |
| 62 | Shaodongensis | Li rong sen in press |
| 63 | Bolivia | Ferre-manzanero et al unpubl |
| 64 | Azorensis | Santiago-alvarez el al unpubl |
| 65 | Pulsiensis | Khalique&khalique unpubl |
| 66 | Graciosensis | Santiago-alvarez el al unpubl |
| 67 | Vazensis | Santiago-alvarez el al unpubl |
| 68 | Thailandensis | Chanpaiaeng et al unpubl |
| 69 | Pahangi | Seleena and lee unpuble |

خصائص بكتريا باسيليس ثورينجيسيز Characterization

باسيليس ثورينجيسيز (Bacillaceae) بكتريا موجبة الجرام تكون جراثيم وهي ترتبط بشكل قريب من العديد من أنواع الباسيليس الأخرى بما فيها B.cereus. بالرغم من أننا نشير إليها بلفظ المفرد B.t. فإنه قد اتفق على أن B.thuringiensis عبارة عن

معقد من تحت الأنواع ومعظمها تنتج أجسام بللورية خلال التجزئ. هذه الأجسام البللورية تحتوى على الدلتا-أندوتوكسينات D-endotoxins التى تبيد الحشرات والتى جعلت من B.t. مصدر ذات قيمة فى السيطرة المتكاملة للآفات الحشرية IPM. لقد أدى التشابه بين B.t. وبكتريا B.cereus الى الاهتمام والحدس من أن النوع الأخير يستطيع إنتاج سموم معدية فعالة على الثدييات entereotoxins والتى تسبب التهابات معدية. كلا النوعين يشتركان فى الصفات الخارجية "الفينولوجية" والبيوكيميائية ولكن B.t. يمكن أن تميز بوجود الأجسام البللورية والتى تتكون خلال التجزئ. لقد أدى تحليل الحمض النووى "دنا DNA" والصفات البيوكيميائية الى أنه قد يكون B.t. و B. cereus نوع واحد حيث أن الاختلافات بينهما صغيرة جدا وتتركز أساسا فى البلازميد. العديد من دلتا-أندوتوكسين الذى يشفر الجينات تنشأ من البلازميد مما يوضح أن هذا الطراز الفينولوجى حساس للفقد وذات قدرة على الانتقال لأنواع قريبة بما فيها B.cereus. لذلك فإن التمييز بين النوعين غير واضح وسوف يستمر الوضع التقسيمى محل جدل بين رجال التقسيم. ومع ذلك فإن الحفاظ وصيانة B.t. كنوع مستقل مازالت ذات أهمية عملية فى تعريف هذه المجموعة الخاصة من البكتريا السامة للحشرات.

التقسيم السيرولوجى Serotyping من أكثر الطرق المستخدمة شيوعا للفرقة بين المجاميع داخل نوع B.t. ولكن الصنف السيرولوجى Serovar لا يرتبط دائما ومباشرة بالنشاط الأبادى على الحشرات. فى الوقت الراهن أمكن تمييز ٨٢ طرز سيرولوجى ولكن لم يمكن تقسيم كل العزلات بناء على هذه الطريقة. بالإضافة الى ذلك توجد مشاكل فى التفاعل العسورى cross reactivity مع بعض عزلات B.cereus وهذا يعكس مرة أخرى العلاقة الوطيدة بين النوعان. لقد تطورت طرق تفرقة بديلة لفصل وتعريف سلالات B.t. لقد استخدمت طرق جزيئية مختلفة للكشف عن الجينات المسؤولة عن السمية فى العزلات الفردية وفى المستحضرات التجارية التى تحتوى B.t. Kurstaki والتى يمكن تمييزها من الأصناف السيرولوجية الأخرى باستخدام مثل هذه التكنولوجيات الجديدة. هذه الطرق قادرة كذلك على التفرقة والتمييز بين B.t. و B.cereus على مستوى السلالة (ليس كنوع) كما أنها تكون وسائل جيدة لدراسة السلوك والمصير البيئى لسلالات B.t. المستخدمة فى مكافحة الآفات.

السلالات الفردية لبكتريا B.t. تختلف فى عدد وأنواع التوكسينات التى تنتجها. لقد تم تعريف مايزيد عن ١٧٠ جين متخصص لإنتاج الدلتا-أندوتوكسينات. التوكسينات

الداخلية ترتبط بشكل متخصص مع مواقع المستقبل في أغشية الخلايا في المعى الأوسط للحشرات الحساسة مما يسبب تثقيب في الأغشية. قد يؤدي هذا التثقيب إلى فقد السيطرة والتحكم في تبادل الأيونات بين الخلايا الطلائية وجدار المعدة مؤدياً إلى الموت السريع مع الجرعات العالية. الجرعات الواطية تؤدي إلى خفض حموضة جدار المعدة بما يسمح بإنبات الجراثيم والتضاعف الخضرى السريع والنفوذ في خلايا الدم وحدث تعفن كبير في الدم يتبعه الموت المحتوم. أن دور الجراثيم في العدوى والموت للحشرات في الغالب بسيط ولو أنه في بعض الحالات يمكن للجراثيم أن تنشط فعالية وكفاءة الأندوتوكسينات بدون أن تزيد السمية عما لو استخدمت منفردة. سلالات B.t. قادرة على إنتاج عدد من التوكسينات بالإضافة إلى دلتا - أندوتوكسينات. سلالات بعض الأصناف السيولوجية تنتج البيتا-أكسوتوكسينات B.exotoxins والذي يتميز بأن له نشاط أكبر من التوكسينات الدخلية وقد يكون له بعض نواحي السمية على الثدييات عند الجرعات العالية. لقد ظهر أن سلالات B.t. Kurstaki تنتج الهيموليسين haemolysin وهو يماثل الهيموليسين الذي وجد في B. cereus. الهيموليسينات عبارة عن عوامل العنف الهامة في بعض الممرضات البكتيرية في الفقاريات. بالإضافة إلى ذلك وجد أن بعض عزلات B.t. ينتج كميات صغيرة من السموم المعوية المرتبطة ببكتريا B. cereus وهي التي تسبب الأسهال diarrhoeal-type ولكن B.t. لا تشترك إجبارياً في ظروف B. cereus في الإنسان.

معقد بامبيليس سيريس The Bacillus cereus Complex

باسيلليس ثورينجنيسيز (Bacillaceae) بكتريا موجبة لجرام عضوية الشكل تكون جراثيم. كتيب أو وجيز بيرجى Bergey's Manual للبكتريا التقسيمية (Sneath وآخرون ١٩٨٦) يحتوى على قوائم لأنواع B.T. و B. cereus. لقد لوحظ أنه بناء على الاختبارات الفينولوجية اقترح لوجان وبيركلى (١٩٤٨) أن B.t. ما هي الا تحت نوع البكتريا B. cereus التقسيم الذي بنى على بيانات تتابع الحامض النووي 16 Sr RNA. جمع B. cereus مع B. mycoides و B. anthracis داخل مجموعة B. subsp. B. anthracis. بينما اعتبرت B.t. هي البكتريا الأساسية في إبادة الحشرات فإن الأفراد الآخرين في المجموعة تحتوى على سلالات ذات سمية على الثدييات. بعض من سلالات B. cereus تنتج توكسينات تسبب مشاكل جوفمعية في الإنسان بينما B. anthracis تنتج مرض حمى

الجمرة الخبيثة في الثدييات. لذلك فإن التمييز بين هذه الأنواع وبكتريا B.t. ذات أهمية من منظور الأمان على الثدييات.

خلال التجزئ تقوم B.t. بإنتاج كلا الجراثيم الداخلية وأجسام البلورية أو الأجسام الجراثيم الخارجية parasporal داخل غلاف الجرثومة sporangium . جسم الجرثومة الخارجى فى الغالب يكون سام لمجموعات خاصة من الحشرات وكذلك يمكن أن توجد العديد من البلورات البروتينية المختلفة (دلتا - أندوتوكسينات) ذات الفعل الأبادى على الحشرات فى تحت أنواع مختلفة من B.t. وسلالاتها. أن وجود أو غياب الأجسام البلورية هو الصفة الرئيسية التى تستخدم للفرقة بين B.t. وسلالات B.cereus وكلاهما وجدت متوزعة وشائعة بشكل كبير فى التربة. بالرغم من حقيقة أن الجينات التى تشفر البلورات (+ Cry) غالبا تنشأ من البلازميد plasmid-borne إلا أن ذلك يوضح أن الطرز الفينولوجى للبلورة حساس للفقد وذات مقدرة على النقل للأنواع الأقارب. لقد إتضح أن نقل البلازميد يحدث فى خارج الكائن وهذا قد يزيد من احتمال الحصول على سلالات Cry⁺ لبكتريا B. cereus و B.anthraxis (جونزاليس وآخرون، ١٩٨٢). لقد وجد هيلجا سون وآخرون (١٩٩٨) أن العديد من العزلات الطبيعية التى لا تنتج بلورات خارجية الجراثيم وجدت سامة لحشرات حرشفية الأجنحة. لقد أقترح احتمال اشتراك أندوتوكسين ذائب أو بروتينات تعمل على إبادة النموات الخضرية (VIP's).

العلاقة التقسيمية بين أفراد المجموعة غير واضحة وأسباب صغر الاختلافات بين B.t. و B. cereus والتى قد تكون أساسا راجعة لاساس البلازميد. الأجسام المضادة الواطية قد تنشط عبوريا بين B.t. و B. cereus مما يوضح التجانس الوثيق بين هذه الأنواع. لم تتمكن الاختبارات البيوكيميائية والفسولوجية دائما من التفرقة والتمييز بين الأنواع. لقد أقترح كارلسون وآخرون (١٩٩٤) أن B.t. و B. cereus يجب إعتبارهما كنوع واحد بناء على تحليل الحمض النووى دنا فى الكروموسومات وكذلك الفرد الكهربى متعدد المواقع للأنزيم (MEE). أظهرت دراسات تتابعات DNA لمناطق الجين المحفوظة أقترح أن النوعين قد يكونا سلالات لنوع واحد. لقد استخدم هيلجا سون وآخرون (١٩٩٨) طريقة MEE وقاموا بفحص التنوع الوراثى والعلاقات بين B.t. و B.cereus من المصادر الطبيعية. أستنتج الباحث أن هذين النوعين من التربة لهما درجة عالية من الدمج وقليل من القلونة clonality.

التوصيف بواسطة الطرق التقليدية الكلاسيكية : Classical methods

الطرق الفينولوجية Phenotypic methods: التعريف التقريبي للأنواع داخل معقد B. cereus يمثل مشكلة بسبب أن الأنواع تشترك في العديد من الخصائص الفينولوجية والبيوكيميائية. الطرق المستخدمة تشمل السيرولوجيا السوطية والوصف الخارجى للبلورات (مورفولوجى) والتفاعلات البيوكيميائية وكذلك التقييم الحيوى. هذه الطرق مجهدة جدا مما يجعلها غير قياسية للفرقة بين جماعات كبيرة من عزلات B.t. بالرغم من هذه الصعوبة فإن بعض هذه الطرق مستمرة فى الاستخدام لتوصيف وتمييز أنواع B.t. جنبا الى جنب مع الطرق الجزيئية الحديثة المتطورة (Hansen وآخرون و ١٩٩٨). التوصيف البيوكيميائى يبدو من الصعوبة بمكان بسبب حدوث تفاوت فى استجابات النمو كما أن الخصائص البيوكيميائية لا ترتبط دائما بنتائج اختبارات التمييز السيرولوجى. لقد تم تطوير بيئة إختيارية متخصصة لعزل B.t. وبعض من هذه الطرق تساعد فى التمييز والفرقة بين أنواع الباسيليس. مثال ذلك تطوير طرق العزل الأولية بما يسمح بعزل جراثيم B.t. من العينات البيئية.

طريقة إنتخاب الخلايا acetate selection (مارتن وترافرز ، ١٩٨٩) بنيت على ملاحظة أن جراثيم معظم سلالات B.t. لا تثبت فى وجود تركيزات عالية من منظم الوسط الصوديوم وهذه الصفة عندما تدمج مع البسترة يمكن استخدامها فى فصل B.t. من السلالات الأخرى المكونة للجراثيم. هذه الطريقة لا يبدو أنها تقدم استرجاع أعلى من الطرق الأخرى الأكثر بساطة. حديثا تمكن الباحثان فاسكونيسيليس وراينوفيتش (١٩٩٥) من تطوير بيئة إختيارية لعزل B. cereus من الغذاء والتي يمكن تمييز مستعمرات B.t. و B. cereus فى الغذاء على أساس الخصائص المورفولوجية واللون. لقد أنتقد جولسون وبيسوب (١٩٩٦) عن الاسترجاع الفعال لعزلات B.t. من عينات البيئة بواسطة إستغلال مقاومة B.t. الداخلية لظاهرة البنسلين. إستخدام وحدات التعريف التجارى (VITEX ، API) المبنية على الاختبارات البيوكيميائية فشل فى التمييز أو الفرقة بين أنواع الباسيليس بشكل صحيح (Ibert وآخرون ، ١٩٩٦). أن إيجاد حزمة من الطرق لاسترجاع B.t. من البيئة تعتبر الأقتراب الأفضل للتأكد من التنوع الوراثى. لقد وجد لورانس وآخرون (١٩٩١) صعوبة فى التمييز بين B.t. و B. anthracis ، باستخدام الكشف عن الأحماض الأمينية بالكروماتوجرافى الغازى. على نفس المنوال

أظهرت الدراسة التي قام بها Zahner وآخرون (١٩٨٩) في مجال التباين الأنزيمي أن B.t. و B. cereus توضع عزلاتهما في نوع واحد.

التقسيم تبعاً للنوع السيرولوجي: Serotyping

تقسيم تحت الأنواع أو الأصناف بناء على النوع السيرولوجي باستخدام الأصناف السيرولوجية - H (الأنواع السيولوجية السوطية) أدت إلى تعريف ٦٩ نوع سيرولوجي و ١٣ مجموعة تحت أنتيجينية مما يعطى أجمالاً ٨٢ صنف سيرولوجي (ليكاديت وآخرون، ١٩٩٩). بالرغم من أن التقسيم السيرولوجي يعكس فقط واحدة من خصائص النوع فإنه من أكثر الطرق الشائعة في التقسيم على مستوى العالم كما أنه أستقر قياسياً. لقد تم تطوير طرق سريعة ودقيقة واقتصادية لتسهيل التقسيم السيرولوجي لسلاسل B.t. بينما التقسيم السيرولوجي السوطي ساعد كثيراً في العزل بغرض التقسيم إلا أن هذا التكنيك له محدودية ونقص بالذكر أنه قد ثبت وتؤكد عدم عقلانية استخدام التقسيم السيرولوجي كدليل للتنبؤ عن النشاط الأبادي. مثال ذلك أن (H8 a 8b) يشمل عزلات نشطة ضد حشرات حرشفية وغمدية وثنائية الأجنحة.

هناك ثلاثة مشاكل إضافية من الناحية العملية في التقسيم السيرولوجي باستخدام الأنتيجينات - H. في البداية فإن كل السلاسل داخل النوع السيرولوجي ليست لها نفس نظام التوكسين أو تكاملة. مثال ذلك التوكسين Cry IC الفعال ضد حشرة دودة ورق القطن وجد بشيوع أكثر في الأنواع السيرولوجية H6 و H7. كذلك وجد أن سلالة H1 وجد بها الجين الذي يشفر هذا التوكسين (ليكاديت وآخرون، ١٩٩٩). ثانياً فإن النشاط العبوري للمصل المضاد للبكتريا B. cereus و B. thuringiensis يخلق صعوبات كبيرة. لقد أثار هذا الباحث ومعاونوه أن ٩٢ من بين ١٩٤ سلالة B. cereus تم اختبارها تكتلت بواسطة المصل المضاد (في الغالب H ٤، ٥، ١٠، ٦، ٧). لقد إتضح أن عدد التفاعلات العبورية للمضادات الأنتيجينية - H بين سلاسل B. cereus تزداد ربما بسبب الزيادة في الأصناف السيرولوجية المعروفة. بالإضافة إلى ذلك فإن حوالي ٣% من عزلات B.t. تتكتل ذاتياً ولا يمكن تقسيمها سيرولوجياً بينما بعض سلاسل B.t. ليس لها سوطيات مع أنها قسمت سيرولوجياً (B.t. Wuhanensis).

مما يثير التشويق أنه بينما التقسيم السيرولوجي هو الأكثر شيوعاً لعمل مجموعات عزلات B.t. إلا أن تحت الأنواع تقسم إلى مجاميع بناء على النشاط الأبادي ضد الحشرات. هذا قد يؤدي إلى العديد من تحت الأنواع تتقاسم نفس النوع السيرولوجي مثل B.t. Gelechidae, B.t. berliner, B.t. thuringiensis. لا توجد طرق تعتبر كدليل عن التشابه بشكل عقلائي عند مقارنتها بالعلاقات الوراثية.

الطرق التي تعتمد على الحامض النووي "الدنا" DNA based methods

لقد تأكد أن طرق التوصيف التي تعتمد على الخصائص الفينولوجية ليست دقيقة للاستخدام في الدراسات الخاصة بالنواحي البيئية والسلوك لبكتريا B.t. بسبب أن هذه الطرق لا تقوم تعريف شامل ودقيق وفي الغالب تفشل في التمييز بين السلالات القريبة الإرتباط. لقد أدى التقدم الحديث في البيولوجيا الجزيئية إلى تطوير الطرق التي تعتمد على DNA قادرة على التفرقة بين الأنواع وفي داخل النوع نفسه. هذه الطرق تتمكن من تمييز السلالات الفردية والعزلات الفردية بما يسمح بمعرفة السلوك البيئي للسلالات التي تستخدم في مكافحة الآفات. هذه الطرق يمكن أن تستخدم كذلك في تعريف وجود أو غياب جينات الأندوتوكسين الخاصة. هذا يعني أنه في الأماكن تقرير ماذا كانت السلالة الخاصة قد فقدت أو اكتسبت جينات دلتا-أندوتوكسين في البيئة.

طرق PCR : تفاعل سلسلة البوليميريز (Polymerase chain reattion (PCR من الطرق الجيدة القادرة على السماح بتضاعف التتابعات المستهدفة للدنا ملايين المرات. هذا التكنيك له إستخدامات متعددة ويمكن يستخدم لتكبير مناطق معروفة في الحامض النووي "الدنا" وكذلك المقارنة الوراثية بين العزلات التي لا يعرف عنها إلا القليل. تستخدم ال PCR البادئات Primers وتتابعات قصيرة من الدنا والتي قد تكون في نهاية الشريحة التي تحت التكبير. لقد تم أحداث تتابع للعديد من جينات التوكسين في بكتريا B.t. كما استخدمت طرق PCR مع بادئات خاصة ومتخصصة للكشف عن وتوصيف جينات التوكسين في عزلات B.t. الفردية. لقد أجرى Carozzi وآخرون (١٩٩١) تحليل PCR لتعريف الدلتا-أندوتوكسينات المختلفة وأشاروا إلى تتابع ١٢ بادئ تميز بين ثلاثة أقسام كبرى من جينات التوكسين. لقد استخدم تكنيك التشكل المتعدد المقيد طول الشريحة Restriction fragment length polyymorphism (RFLP) بالدمج والمشاركة مع

PCR فى تعريف الجينات التوكسينية الجديدة (Kuo and chak, 1969). لقد استخدمت بادئات ذات تجانس مع المناطق المختلفة لتعريف تحت المجاميع داخل عائلة جين Cry. تفاعل سلسلة البوليميريز - البادئ الأولى هي (AP-PCR) طريقة بادئ عشوائية تستخدم بادئات صغيرة غير متخصصة لتكبير شرائح الحامض النووى "الدنا DNA". يتم مقارنة مجموع الشرائح وكلما زاد عدد الحزم بنفس الحجم كلما كان تماثل السلالات أكثر. قد تستخدم الطريقة للفرقة والتمييز بين المنتجات التجارية المحتوية على B.t. Kurstaki. لقد استخدمت طرق AP-PCR لتعريف السلالات التجارية لهذه البكتيريا باستخدام الحامض النووى DNA الكلى من المستعمرات البكتيرية الفردية كصفائح. عندما يستخدم بادئ فردى تكون هذه الطريقة قادرة على إنتاج بصمات "دنا" متميزة تفرق بين 33 صنف سيرولوجى. لقد أصبح ممكنا التمييز بين B.t. و B.cereus بهذه الطريقة. هذا التكنيك ذات إمكانية وجودة فى التعريف والفرقة بين سلالات B.t. ولكنه غير كافى أو دقيق فى الفصل بين B.t. و B.cereus كأنواع.

حامض الرنا الريبوسومى Ribosomal RNA

لقد قام Priest وآخرون (1994) بفحص النظام المقيد لجين الرنا الريبوسومى فى سلالات B.t. وأنواع الباسيلليس المرتبطة بها. لقد طور جيفيك وآخرون، 1997 مجسات دنا DNA Probes بناء على المنطقة الرابعة VI region للحامض النووى 16SrRNA لتعريف B.cereus و B.t. هذه المجسات عالية التخصص: مجس B.cereus لا يعطى إشارة أو استجابة مع سلالات B.t. والذي يختلف فى ثلاثة نيوكليوتيدات فقط عن B.cereus بينما سلالات B.t. تكشف بمجس B.t. فقط. سلالات B.t. المعرفة كلها إيجابية الاستجابة مع البادئات التى تستهدف جينات الكراى. هذا بالرغم من أنه لم تقارن سلالات قياسية دولية على منطقة VI. لقد استخدم Dafforchio وآخرون (1998). الناسخ الداخلى للمسافات (ITS) بين جينات الرنا الريبوسومية 16s و 23s كدلائل أو معلومات جزيئية فى محاولة للفرقة بين أنواع الباسيلليس. مع استخدام خمسة عزلات B.t. فقط وجد الباحث أن بصمات ITS فشلت فى الفرقة بين B.cereus و B.mycoides. و B.thuringiensis. بفحص أقصر ناسخ ITS بتفصيل أكثر أمكن التمييز بين

B.mycooides والنوعين الآخرين بواسطة التحليل المقيد أو القاطع restriction بينما لم يمكن فصل B. cereus و B.t.

من الناحية العملية توجد حاجة لدمج أكثر من طريقة. مثال ذلك ماوجده هانسن وآخرون (١٩٩٨) من أن الطريقة الجزيئية مثل تهجين المستعمرة Colony-hyberdization كانت مناسبة للتمييز بين مجموعات كبيرة من البكتيريا. عندما تدمج بيانات تهجين المستعمرة مع تحليل RAPD (الدنا متعدد الأشكال المكبر عشوائيا) فإنه يمكن عمل مجاميع للعزلات بناء على الكفاءة الوراثية وبصمة الدنا كما أن التوصيف اللاحق بطرق PCR والطرق الفينولوجية يمكن أن يجرى بشكل أكثر كفاءة.

مقارنة الكروموسومات Comparison of chromosomes

من الأقترابات الحديثة للمقارنة بين عزلات B.t. وتحت الأنواع وكذلك B. cereus عمل خريطة للكروموسومات حيث يتم مقارنة موضع الجينات المعروفة للعزلات المعروفة. لقد قام لوثرجرين وآخرون (١٩٩٨) بمقارنة وضع جينات العنف لسلالات بكتريا B.t. gelechiaie و B.t. berlinere و B.t. thuringiensis وكلها طرز سيروولوجى I. لقد وجد الباحث أن الطرز B.t. berliner و B.t. gelechiaie متماثلة فى موضع الجين ولكن هناك اختلافات لا يمكن من التفرقة أو التمييز كروموسوميا بين B.t. alesti و B.t. Kurstaki مقارنة الخرائط الطبيعية للكروموسومات استخدمت لمقارنة B. cereus و B.t. باستخدام الفرد الكهربى فى مجال (PGFE) ومضمم الأنزيم المقيد. لقد وضع كارلسون وكولستو (١٩٩٣) خريطة طبيعية للكروموسومات B.t. باستخدام الأنزيم المقيد Not 1 مع فحص سلالات B. cereus و B.t. أمكن استنتاج أن النوعين فى غاية القرب والأرتباط. لقد أوضح كارلسون وآخرون (١٩٩٦) أن الخريطة الطبيعية للكروموسوم سلالة B. cereus متماثلة تماما مع B.t. canadensis. أظهرت دراسات أخرى إعتمدت على طرق MEE, PFGE أن النوعين متداخلان مع بعضهما.

التوكسينات Toxins:

من المعروف أن سلالات B.t. تنتج عدد من التوكسينات المختلفة بعضها ذات مخاطر صحية. لذلك فإن اعتبار الأمان والتأثيرات غير المستهدفة لمختلف أصناف B.t. تتطلب فهم العديد من التوكسينات المختلفة الناتجة بواسطة البكتريا داخل النوع أو بين

الأنواع. التوكسينات التي تنتج بواسطة بكتريا B.t. تشمل دلتا-أندوتوكسينات التي لها نشاط أبادي ضد الحشرات والأكسوتوكسينات التي قد يكون لها تأثيرات سامة على الثدييات مع الجرعات العالية والهيموليسينات والتوكسينات المعوية (من النوع الذي يسبب الأسهال). التوكسينات المعوية في B. cereus مسئولة عن التسمم الغذائي وبكتريا B.t. تستطيع إنتاج توكسينات مماثلة. سوف نناقش في موضع لاحق التأثيرات التي تحدثها التوكسينات المختلفة على الكائنات غير المستهدفة خاصة الثدييات.

الأنزيمات والتوكسينات الخارجية Exoenzymes and exotoxins

البيتا-أكسوتوكسين Beta-exotoxin: البيتا-أكسوتوكسين (يطلق عليه كذلك ثورنيجنيسيز ، التوكسين الثابت حرارياً، توكسين الذباب) تم الكشف عنه في سلالات من عديد من تحت الأنواع (جدول ١-٢). هذا التوكسين قليل الوزن الجزيئي ثابت ضد الحرارة (٧٠°م لمدة ١٥ دقيقة) كما أنه له مدى واسع من النشاط والفاعلية حيث تقتل مختلف حشرات حرشفية الأجنحة وثنائية وغشائية ونصفية ومستقيمة الأجنحة وكذلك الليماتودا والأكاروس البيتا - أندوتوكسين أكثر سمية عندما تعامل لا معويًا Parenterally عما هو الحال مع التناول مع الغذاء لأنها لن تمر خلال جدار المعدة وتلتهار بواسطة أنزيمات فوسفاتيزيس المعدة (Sebesta وآخرون ١٩٨١). النوع I أكسوتوكسين تم الكشف عنه في السلالات من الطرز السيرولوجية B.t. ١، ٩، ١٠ بينما البيتا-أوكس توكسين الثاني النوع I تم عزله من الطرز السيرولوجي B.t. morrisoni- Levinson) 8ab وآخرون ، ١٩٩٠). لقد وجد الباحث أن البيتا-أكسوتوكسين تشفر بواسطة دلتا-أندوتوكسين كراي - التي تشفر البلازميد في خمسة سلالات تم فحصها في حالة واحدة على الأقل يكون البلازميد سهل النقل بواسطة النظام الطبيعي للنقل الارتباطي الموجود في B.t.

بينما ينكسر الأكسوتوكسين ويفقد نشاطه في القناة الهضمية للحشرات يبدو أن معظم الحشرات حساسة إذا استخدمت جرعة عالية بما فيه الكفاية. الحشرات التي تعامل بالأكسوتوكسين تقف عن التغذية وتموت خلال عدة أيام من التعرض. البيتا-أكسوتوكسين يمكن أن تسبب تأثيرات تشويحية خلقية وتحديث خلل في أنسلاخ اليرقات أو العذارى. لقد وجد أنه مع الأكاروسات يكون للأوكسوتوكسينات فعل مورفولوجي وراثي أو تأثير على

الغدد المسؤولة عن التغذية Gonadotropic مشابه لما يحدث مع مشابهات الهورمونات Juvenoids (Petrova, 1987). الحشرات البالغة التي تعيش بعد المعاملة بالبيتا أكسو توكسين قد تنقص فترة الحياة وتخفض من الكفاءة التناسلية. السم الخارجى لبكتريا B.t. tolworthi سبب تأثيرات غير قاتلة على ذباب اللوسيليا على صورة تداخل فى أنسلاخ اليرقات بينما أحدث نقص فى أنزيمات الهضم فى يرقات دودة ورق القطن. بالنظر الى الأمان على الكائنات غير المستهدفة تشير الى حقيقة أن السم الخارجى بيتا يمكن أن ينشط الدلتا-أكسوتوكسين ضد الحشرات ذات المقاومة الطبيعية. هذا التنشيط قد ينتج من التأثير التثبيطى للبيتا-أكسوتوكسين على إعادة خلق خلايا المعدة الوسطى التالفة.

التوكسين الخارجى قادر على عبور أغشية الخلية والنواة فى أجهزة الثدييات ومن ثم فإن تعرض الفقاريات للبيتا-أكسوتوكسين تؤدي الى تكوين مواضع ضرر فى الكبد والكلى والغدد الأدرينالية. البيتا-أكسوتوكسين عندما يعامل على الدواجن يؤدي الى فقد النشاط وأنتاج بيض ذات حجوم صغيرة. لقد قام Meretoja وآخرون (1977) بفحص السمية الطفورية للسم الخارجى لبكتريا B.t. فى النظم المختلفة للثدييات. لقد وجد فى مزارع للدم الأدمى أن التركيزات عالية السمية جدا من الأكسوتوكسين تزيد من التشوهات الكروموسومية بشكل معنوى.

بسبب السمية على الفقاريات فإن معظم التجهيزات التجارية للـ B.t. تتكون من تحت أنواع أو عزلات لا تنتج البيتا-أكسوتوكسين. كما هو الحال مع تسجيل المبيدات كى تستخدم على الغذاء فى أمريكا فإن المواد الفعالة فى بكتريا B.t. يجب أن تختبر للتأكد من عدم وجود البيتا-أكسوتوكسين (Mc Clintork وآخرون 1995). طرق التفرقة اعتمادا على وجود السم الخارجى تعتمد أساسا وفى الأصل على وقت الاستهلاك والتحليل الحيوى الصعب على الفراشات يوجد العديد من المعامل فى الوقت الراهن قادرة على استخدام الكروماتوجرافى السائل فائق المقدرة (HPLC) للكشف الكمي عن البيتا-أكسى توكسين فى البيرة المتخمرة وعينات المستحضرات.

لقد كان يعتقد فى البداية أن إنتاج السم الخارجى محدودا أو قاصرا على بعض الطرز السيرولوجية السوطية حتى مع التسليم بأن التحول والأرتباط يمكن أن يحدث بين الطرز السيرولوجية. من الناحية التاريخية فإن الطراز السيرولوجى استخدم ببساطة للتنبؤ بوجود أو غياب التوكسين الخارجى. مثال ذلك أنه لم توجد أية تقارير تشير الى إنتاج التوكسينات الخارجية من B.Kurstaki حتى أعلن Ohba وآخرون (1981-2) عن

عزل توكسين خارجي بواسطة سلالة الباسيليس كورستاكي. لقد قام ليفنسون وآخرون (١٩٩٠) باختبار نوع سلالات عشرة من الطرز السيرولوجية لإنتاج التوكسين الخارجي ووجدوا أن الطرز السيرولوجية ١، ٩، ١٠ كانت من المنتجات للأكسوتوكسين من النوع I بينما الطرز السيرولوجي Bab ينتج الأكسوتوكسين من النوع الثاني II. السلالات التي تنتج التوكسين الخارجي وجدت كذلك في العديد من الأنواع السيرولوجية الأخرى (جدول ١-٢). حيث أن السلالات المنتجة للتوكسين الخارجي مازالت غير معروفة للعديد من الطرز السيرولوجية فإن إنتاج التوكسين الخارجي يختلف بشكل كبير فيما بين الطرز السيرولوجية. التصنيف السيرولوجي وحدة غير كافية للتنبؤ عما إذا كانت السلالة منتجة للتوكسينات الخارجية. لقد تم وصف مجموعة جديدة من التوكسينات الخارجية من بكتريا *B.t. israelensis* بواسطة Iueiser وآخرون ، (١٩٩٢) و Horak وآخرون (١٩٩٦). لقد وجدوا نشاط وفعالية لنواتج التمثيل الذاتية في الماء وسم البكتيريا الأسرائيلية ضد القواقع المائية والديدان الشريطية. لقد وجد أن التوكسين الفعال ينتمي لنفس قسم البيتّا - أكسوتوكسين وليس له سمية على الثدييات.

الهيموليسينات Haemolysins :

الهيموليسينات أو ليسينات الدم تعمل على تحليل كرات الدم في الفقاريات وهي عوامل هامة للعنفوانية في العديد من الممرضات البكتيرية للفقاريات ويعتقد أنها عوامل هامة بوجه عام لأحداث الأمراض الجهازية في الإنسان. لقد وجد أن الهيموليسينات المنقاة من *B.t. Kurstaki* تماثل تماما هيموليسينات *B. cereus* (ماتسوياما وآخرون، ١٩٩٥).

التوكسينات المعوية Enterotoxins:

لقد وجد أن عزلات *B.t.* تنتج التوكسينات الداخلية من النوع المسبب للأسهال في *B. cereus* (كارلسون وآخرون ١٩٩٤، عبد الحميد ولاندين ١٩٩٤). التوكسينات المعوية للباسيليس سيريس مسئولة عن أعراض التسمم الغذائي بعد تناول هذه البكتريا. لقد وجد عبد الحميد ولاندين (١٩٩٤) أن ٢٣ عزلة *B.t.* من بين ٤٠ جمعت من التربة في السويد (عرفت ثورنيجنيسيز ، كورستاكي) جاليري، ويندروليمس، دارماستدينسيز، أسرائيلينيز) تنتج السم الداخلي المعوي المسبب للأسهال. يتم الكشف عن هذا التوكسين الداخلي باستخدام

وحدات التكتل السالب المعكوس Bc Et- RPLA التى تنتج بواسطة Oxoid. لقد قام Damgaard وآخرون (١٩٩٦-١) بعزل توكسينات معوية والسلالات التى تنتجها B.t. من الأطعمة. لقد تم فحص السلالات لمعرفة تأثيراتها الخلوية السامة Cytotoxic كدليل للنشاط كسم معوى.

الأنزيمات الخارجية Exoenzymes:

بكتريا B.t. تنتج عدد من الأنزيمات الخارجية التى تلعب دورا فى مرضية الحشرات. مثال ذلك أنفراد وأطلاق أنزيمات الكيتينيز والبروتينيز والتى يعتقد أنها تحدث خلل فى الغشاء المعدى مما يحقق زيادة فى الغشاء الطلائى للمعدة. لقد تم الكشف عن تضمين أثنان من أنزيمات الفوسفوتيز ليبيريس فى عنفوانية عزلة B. gelechiat رقم ١٣ والتى تعاني من نقص البلورات ولكنها تحتفظ بالعنفوانية عندما تحقن فى يرقات الحشرات.

البروتينات الخضرية كمبيدات حشرية Vegetative insecticidal protein

حديثا أمكن عزل قسم جديد من التوكسينات الأبادية للحشرات وهى البروتينات الخضرية كمبيدات حشرية (VIPs) من بكتريا الباسيلليس B.t. المركب Vip 3A بروتين جديد ذات نشاط عريض ضد حشرات حرشفية الأجنحة عرف لأول مرة بواسطة الباحث Estruch وآخرون، (١٩٩٦). لقد ظهرت فاعليته ضد الدودة القارضة السوداء، دودة ورق القطن ودودة البنجر ودودة براعم الدخان ودودة اللوز الأمريكية ودودة كيزان الخرة. لقد وجد أن ١٥% من سلالات B.t. التى فحصت فيها سلاسل متجانسة من البروتين Vip 3. البروتينات ذات ٧٩١ حمض أميني والتى أمكن التنبؤ بوجودها لاحتوى على سلاسل معروفة من البروتينات ولكنها تظهر فى مرحلة النمو الخضرى (Estruch وآخرون، ١٩٩٦). لقد اختلفت حساسية الحشرات المختلفة لهذه البروتينات. الخلايا الطلائية فى معدة الحشرات الحساسة تمثل الهدف الأول للبروتين الأبادى Vip 3A ومايستتبع ذلك من تحلل تمثل الميكانيكية الأولية للموت (Tu وآخرون ١٩٩٧-١). حتى الآن لم يتم تحديد أهمية بروتين VIPs فى السمية.

دلتا أندوتوكسين *Delta – Endotoxins*:

عند التجريم فإن غالبية سلالات B.t. تنتج أجسام بللورية تحتوي على دلتا – أندوتوكسين ذات الصفات الأبادية ضد الحشرات. البروتين البلورى يمثل ٢٠-٣٠% من البروتين البكتيرى الكلى عند التجريم (Boucins and pendland, ١٩٩٨). تتكون الأجسام البلورية من توكسينات أولية وحيدة monomeric protoxins. إنهيأر الأجسام المضادة بواسطة الأنزيمات المحللة تنتج بروتينات سامة أصغر (دلتا-أندوتوكسينات). هذا السلوك يختلف فيما بين السلالات ولكن فى معظم الحالات فإن سلالات B.t. تنتج أجسام تحتوى على خليط من دلتا –أندوتوكسينات. مثال ذلك أن بكتريا B.t. Kurstaki HD-1 تحتوى على ثلاثة Cry 1 (130 Kda) وأثنان Cry 2 (70 Kda) للأندوتوكسينات فى نفس البلورة. هناك سلالات B.t. أخرى تحتوى القليل من دلتا – أندوتوكسينات كما فى حالة tenebrionis B.t. هذه التوكسينات الداخلية والتي تختلف فى نشاطها تجاه الحشرات تكون أجسام بروتينية. لقد تم تعريف مايزيد عن ١٧٠ جين مختلف تشفر دلتا – أندوتوكسينات. نشاط وكفاءة دلتا – أندوتوكسين محصور فى القناة الهضمية.

العديد من جينات السمية للـ B.t. بما فيها بعض التوكسينات الخارجية تشفر بالدنا الكروموسومى الأكسترا على بلازميدات ذات أحجام متفاوتة وأعداد مختلفة لكل خلية. فى العادة فإن جينات التوكسينات تقع على البلازميدات الكبيرة (40-150 Mda) وقد إتضح وجود أكثر من جين توكسين واحد على الأهليج كما فى البكتريا B.t. الأسرائيلية فيها أربعة جينات توكسينية على نفس البلازميد 72 Mda (Lereclus وآخرون، ١٩٩٣). ليست كل جينات الأندوتوكسين للـ B.t. تقع على البلازميدات حيث أن بعضها يقع على الكروموسومات ولو أن وجود الميجا – بلازميدات لا يمكن تجاهله. لقد وجد Carlson and Kolsto (١٩٩٣) أن التوكسين من النوع Cry IA يوجد على الكروموسوم فى أربعة سلالات وكانت خارج الكروموسومات فى أربعة سلالات وكانت على الكروموسومات وخارجها فى سلالتان منها.

بالإضافة الى إنتاج توكسينات كراى Cry فإن العديد من سلالات B.t. تنتج كذلك أندوتوكسينات أصغر ذات تأثيرات خلوية Cytolytic. 25-28 Kda هذه الأندوتوكسينات تشمل توكسينات Cyt IA من الباسيليس الأسرائيلية و B.t. morrisoni (PG-14) و yt 2A من B.t.kyushuensis. على عكس الكراى دلتا –أندوتوكسينات وكذلك

الأندوتوكسينات Cyt تستقر مع الدلتا - كراى - أندوتوكسينات فى جسم البلورة لقد كان الأندوتوكسين Cyt 1 A من الباسيلليس الأسرائيلية أول الأندوتوكسينات الخلوية Cyt التى تم توصيفها. البلورات التى تذاب تحت الظروف القلوية تفرد توكسينات أولية يمكن أن تنشط بواسطة الأنزيمات المحللة للبروتينات فى الجهاز الهضمى. لقد وجد أن التوكسينات Cyt 1A المذابة تحلل خلايا الدم وخلايا أجسام الحشرات أما التوكسينات غير المذابة لا تحقق هذا النشاط.

أظهر الفحص بالميكروسكوب الضوئى أو الألكترونى أن البلورات لها أشكال مختلفة تم وصفها. لقد ثبت أن البلورات ثنائية الهرمية ترتبط بالنشاط ضد حشرات حرشفية الأجنحة بينما البلورات البيضاوية أو المكعبات فعالة ضد كلا حشرات حرشفية وثنائية الأجنحة. تاريخيا وجد الدلتا - أندوتوكسينات المتخصصة (بروتينات الكراى) مع أجسام مضادة - تضاد الكراى وحديثا أمكن استخدام الطرق الجزيئية لاستيضاح هذا الأمر. لقد تم الإعلان عن أول تتابعات جينية لبلورات البروتين عام (١٩٨٥) ومع تحسين طرق عزل الحامض النووى الدنسا وبكتريا B.t. تم تعريف عدد مميز من جينات التوكسينات وتتابعاتها. تحت مظلة نظام التسمية الأول كانت توكسينات كراى I فعالة ضد حشرات حرشفية الأجنحة، كراى II ضد حرشفية وثنائية الأجنحة، كراى III ضد غمدية الأجنحة، كراى VI ضد ثنائية الأجنحة مع وجود بعض الاستثناءات داخل المجاميع. لقد ظهرت مجموعة كراى خامسة فعالة ضد غمدية وحرشفية الأجنحة والتوكسين يقسم الآن على أنه Cry IIa وهناك آخر Cry II b. هناك (Cry 5 As) فعال ضد الليماتودا. سوف نعاود التسمية والتعديلات التى أجريت على التسميات الأولى فى مواضع أخرى من هذا الكتاب أن شاء الله تعالى.

جدول (١-٢): التوكسينات المختلفة التي تنتج بواسطة سلالات الباسيليس ثورينجيسيز
(مأخوذة من Krieg and Langenbruch ١٩٨١)

| Serovar | H-serotype | B-exotoxin | B. cereus type enterotoxin ¹ | Haemolysin |
|----------------|----------------|---------------------------------------|---|------------|
| Thuringiensis | 1 | + (or 0) | | + |
| Finitimus | 2 | 0 ^b | | |
| Alesti | 3a | 0 | | |
| Kurstaki | 3a,3b | 0 (or + ^{c,d,e}) | | + |
| Sotto | 4a,4b | 0 | +(or + ^f) | |
| Dendrolimus | 4a,4b | 0 (or + ^f) | | + |
| Kenya | 4a,4c | + (or 0) | | |
| Galleriae | 5a,5b | 0 (or + f.g.h) | | + |
| Canadensis | 5a,5c | 0 | | |
| Entomocidus | 6 | 0 | | |
| Ai = awai | 7 | 0 | | |
| Morrisoni | 8a,8b | 0 (or + ^e) | | |
| Ostriniae | 8a,8c | + ^e (or 0) | | |
| Tolworthi | 9 | 0 | | |
| Darmstadtensis | 10 | + (or 0) | | |
| Toumanoffi | 11a,11b | + (or 0) | | + |
| Kyushuensis | 11a,11c | 0 | | |
| Thompsoni | 12 | 0 (or + ^l) | | |
| Pakistani | 13 | 0 | | |
| Israelensis | 14 | 0 ^j (or + ^{d,k}) | + | + |
| Indiana | 16 | + ^h | | |
| Kumanotoensis | 18a,18b | + (or 0) | | |
| Tochigiensis | 19 | 0 | | |
| Japonensis | 23 | 0 | | |
| Medellin | 30 | 0 | | |
| Wuhanensis | - ^a | + | | |

كيفية أحداث الفعل : Mode of action :

دلتا - إندوتوكسينات delta- Endotoxins

إستهلاك الغذاء المعامل بالأندوتوكسينات يؤدي في العادة إلى توقف يرقات حشرات حرشفية الأجنحة عن الأكل وحدوث شلل في المعدة يؤخر مرور المادة النباتية المهضومة مع السماح للجراثيم بالإنبات واضطراد النمو الخضري. اليرقات التي تأكل غذاء به جرعات عالية من التوكسين تعاني من شلل عام يعقبه الوفاة. أوضحت الدراسات النسيجية "الهستولوجية" أن التوكسينات التي تتفرد من الأجسام البروتينية والتي تنشط من خلال تحليل البروتينات في غشاء المعدة ترتبط بمواقع مستقبلات خاصة على أغشية الخلايا العمادية للمعوى الوسط مما يحدث ثقب تتداخل مع نظم الانتقال الأيوني عبر جدار المعدة الوسطى. مع الجرعات العالية من التوكسينات يحدث تحلل للخلايا الطلائية للمعدة الوسطى مما يؤدي إلى حدوث موت سريع. الجرعات الواطية أو مع الحشرات الأقل حساسية فإن تلف خلايا المعدة يكون كافياً لأيقاف الإفرازات العادية في المعدة والتي تخفض من حموضة الجدار وتسمح للجراثيم بالإنبات. حينئذ تنفذ الخلايا الخضرية وتتضاعف في بيئة الهيموليمف الغنية مما يسبب تلف خلايا الدم والوفاة. يرقات البعوض المعاملة ببكتريا الباسيلليس الأسرائيلية عادة تؤدي إلى توقف الأكل خلال ساعة من المعاملة وبعد ذلك يقل النشاط خلال ساعتان ثم كسل تام بعد أربع ساعات يعقبه شلل عام بعد ٦ ساعات من تناول الغذاء المعامل. معظم عزلات B.t. ليس لها التأثير السريع كما هو الحال مع البكتريا الأسرائيلية. تثبيط التغذية يمكن أن يحدث بعد الأكل مباشرة لجراثيم B.t. والتوكسينات بينما في اليرقات والخنافس يحدث الموت بسرعة (١-٢ يوم) مع اليرقات الحديثة بينما يستغرق حدوث الموت فترة أطول قد تصل لأسبوع مع اليرقات الكبيرة. الحشرات التي تعامل بتركيزات تحت مميتة من B.t. قد تشفى خلال يوم أو يومان من التعرض. لقد تم تسجيل عدد من التأثيرات غير المميتة في أماكن كثيرة.

تخصص المستقبلات على النسيج الطلائي للمعدة ذات أهمية كبيرة ، تحديد النشاط الأبدي ضد الحشرات. الدراسات التي استخدمت فيها مجسات المناعة الكيميائية أظهرت أن توكسينات Cry و Cyt ترتبط مع جدار خلايا المعدة الوسطى. أظهرت تحليلات الارتباط خارج الجسم إلى وجود مواقع ارتباط عالية التخصص على الأغشية. في حالات عديدة وجد الارتباط مع هذه المواقع يرتبط بحساسية الحشرات.

إسهام الجراثيم فى أحداث السمية: دور جراثيم B.t. فى إحداث السمية والعدوى ظلت مثار جدل لفترة طويلة. لقد أشار Navon (١٩٩٣) أنه مع معظم الحشرات حشرية الأجنحة يكون البروتين البلورى هو المسبب الأكبر للموت بينما الجراثيم تلعب الدور الأقل. لقد عُد عَزَل واستخدم توكسينات الكراى هذا القول. بينما يكون ذلك وضع حقيقى فى العديد من الارتباط الخاص بأنواع وتحت أنواع أو سلالات B.t. توجد العديد من التقارير تشير الى أن الجراثيم تنشط نشاط التوكسين أو تسبب الموت مباشرة. نشاط التوكسينات المغطاة من B.t. كورستاكى تزيد ١٤٦ مرة عند إضافة الجراثيم الخالية من التوكسين ضد حشرة *Plutella xylostella*. على نفس المنوال أشار Mc Gaughey (١٩٩٦) أن إضافة الجراثيم نشطت كفاءة الدلتا - أندوتوكسين ضد يرقات فراشة الدقيق الهندى.

فى العديد من البحوث والدراسات استخدمت الطرق الطبيعية لاستخلاص الجراثيم من مستحضرات البلورات النقية والعكس صحيح. الشوائب التى تصل نسبتها ١% أو أقل فيما يطلق عليه المستحضرات النقية غالبا ماتؤثر على هذه النتائج. لقد استخدم أسا وآخرون (١٩٨٧) مستحضرات عالية النقاوة جدا تحصل عليها من قتل الجراثيم بأشعة جاما وكذلك جراثيم خالية من الأندوتوكسين فى أغلفتها (تحصل عليها من طفرة خالية من البلورات). لقد أثار البحا أن الجراثيم النقية أو بلورات *B. aizawai* كانت غير فعالة ضد يرقات دودة الشمع حيث كان التركيز النصفى القاتل ١٠^٦ بلورات/رحم غذاء. إضافة ٠.٠١% جراثيم للبلورات تؤدي إلى موت ٣٦% فى اليرقات بينما ٠.١% جراثيم تقتل ٦٤% يرقات أما LC50 لمخلوط بنسبة ١:١ كانت ٧ × ١٠^٦ جراثيم وبلورات/جم غذاء.

فى يرقات الفراشة العجرية وجد Dubois and Dean (١٩٩٥) أن الجراثيم أو الخلايا الخضرية لعدد من سلالات البكتريا تزيد بشكل معنوى من سمية Cry و Cry 1Aa مع 1 Ac البروتينية البلورية المبيدة للحشرات بما فيها الجراثيم من *B. cereus*. لقد وجد مع *B. megaterium* و *B. subtilis* أنه لا الجراثيم ولا الخلية سامة لوحدها. لقد أظهرت الدراسات مع *B.t. kurstaki* وجد أن إضافة القليل من الجراثيم إلى تركيزات منخفضة من التوكسينات زادت بشكل معنوى من نسبة الموت على الفراشة العجرية من جراء التسمم الدموى كما أن الجراثيم وحدها ليست مرضية.

التأثير المنشط للجراثيم على السمية للباسبيليس B.t. قد تسببت جزئياً بواسطة التوكسين المضاد أو الإضافي في غلاف الجرثومة ولكن يستحب القول بأنه ينتج من النمو الفائق للخلايا الخضرية من الجراثيم المهضومة. الجراثيم يمكن أن تثبت عندما تنخفض درجة حموضة المعدة الحشرة ومن ثم تفقد من جراء المعدة وتسبب تسمم الدم. أتساءل كيف لهذه البكتيريا أن تؤثر على بيض دودة ورق القطن؟

Sublethal effects : التأثيرات غير القاتلة :

التأثير على الكائنات غير المستهدفة عادة يؤخذ من وجهة نظر الوفيات ومع ذلك فإن التأثيرات غير القاتلة والتي يصعب الكشف عنها بسهولة كما في حالة الموت تحدث بالتأكسد. لقد ظهرت تقارير عديدة للتأثيرات غير المميتة لمستحضرات بكتيريا B.t. هناك تأثير الباسبيليس كورستاكي على حشرات حرشفية الأجنحة بما فيها تأخير النمو والتطور ونقص في وزن اليرقات والعذارى وحجمها وخفض في التعذر وخروج الحشرات الكاملة وكذلك النقص العرضي في الكفاءة التناسلية للحشرات الكاملة. لقد إتضح أن الجرعات غير القاتلة للباسبيليس جاليري عندما تؤكل بواسطة يرقات الدودة القارضة إلى تأخير تطور العذارى وخفض إنتاج البيض وخفض النسبة المئوية لخروج الفراشات وخصوبة البيض وطول فترة حياة الحشرة الكاملة وخفض وزن العذارى وأحداث نشوء في العذارى والحشرات الكاملة. قد تمتد التأثيرات خلال الجيل الثاني وقد يزداد طول فترة الجيل.

السلوك الغذائي في بعض الحشرات قد تأثر من جراء التعرض لكميات غير قاتلة من B.t.

الحدوث الطبيعي ودور الباسبيليس في البيئة:

الباسبيليس ثورينجينسيز تحدث طبيعياً وبشكل كلي في البيئة فهي تعتبر من المكونات الشائعة للكائنات الدقيقة في التربة وقد تم عزلها من معظم أوساط المعيشة. لقد تم عزل B.t. من عدد من الحشرات ولم تشير أية تقارير لكونها تسبب أمراض وبائية epizootics خارج المزارع الحشرية في المعمل. دور بكتيريا B.t. في الطبيعة ليس واضح وقد وضعت العديد من الفرضيات. B.t. قد تكون ممرض حشري طبيعي ولو أنه من النادر أن يحدث له تدوير في المجاميع الحشرية مما يجعل منه ممرض أنتقالي نسبياً. كذلك فإن العديد من عزلات B.t. ليست سامة لأي من المكونات المعروفة في مجموع

الحشرة من موقع العزل. قد تكون بكتريا تربة طبيعية دون ارتباط مع العينات الأبادية ضد الحشرات ولو أن B.t. تنمو وتتنافس بشكل فقير نسبيا. من أحد النظريات عن الدور الطبيعي لبكتريا B.t. أن هذه البكتريا ذات ارتباط متبادل المنفعة أو تبادلي مع النباتات كي تقدم الحماية ضد آكلات النباتات.

الحدوث الطبيعي في البيئة: من الناحية التاريخية تم عزل B.t. من البيئات المرتبطة بالمجاميع الحشرية و/أو المادة النباتية. مثال ذلك أن B.t. اكتشفت في البداية في مزارع دودة الحرير وتم الحصول على عزلات كثيرة من مختلف أماكن تربية الحشرات وبيئات المواد المخزونة وأماكن تجهيز الحبوب (ohba, 1966, Bernhard وآخرون, 1997, Kim وآخرون, 1998-1). حديثا تم إجراء دراسات حصر وأستكشافات عديدة حيث تم عزل B.t. من مدى واسع من أماكن المعيشة في العديد من الدول المختلفة. لقد وجد أن النسبة الكبرى 45% من مجموع 3، 53 عزلة جاءت من المواد المخزونة بينما نشأ 25% من التربة. المواد التي وجدت غنية في العزلات النشطة ضد الحشرات كانت من المادة العضوية من عيش الغراب والمواد المخزونة. الفاعلية ضد حشرات حرشفية ونصفية وغمدية الأجنحة لا ترتبط بالأصل والمصدر مما يوضح التوزيع الكامل النسبي للنشاط الأبادي ضد الحشرات وللبكتريا B.t. بوجه عام. لقد وجد أن نسبة عالية من العزلات غير نشطة ضد كل الحشرات كما وجد في دراسات حصر أخرى (مارتن وترافوز, 1989). أوضحت دراسات الحصر الكبيرة أن B.t. لها حدود دنيا من متطلبات النمو لأنها شاملة في التربة وتعيش في أماكن أخرى وقد وجدت عندها مقدرة للنمو الخضري في التربة المعقمة في وجود المواد المغذية ولو أن معظم الدراسات لم تشير إلى نمو وتضاعف في التربة غير المعقمة.

الوجود في التربة: بالرغم من أن هذه البكتريا تم الحصول عليها من الحشرات فإن دراسات الحصر الحديثة أوضحت أن B.t. تتوزع في التربة بشكل متفرق ولكن بشكل متكرر كما أنها تتوزع بشكل عريض واسع على المستوى المحلي والعائلي. لقد قام كثير من العلماء بتحليل عينات تربة تم جمعها من كل أنحاء العالم وأتضح أنها توجد في كل مكان ويمكن جمعها من على الشواطئ والصحاري وسهل التندرا في القطب الشمالي. وجود B.t. لا يرتبط بالحشرات حيث وجد أن بعض البيئات الخالية من الحشرات تحتوي على مستويات عالية من هذه البكتريا. على نفس المنوال قام ديوكا وآخرون, (1981)

بمعزل B.t. من أراضي عديدة تبعد كثيرا عن تجمعات حشرات حرشفية الأجنحة في كل مربى أو مناطق تخزين الحبوب في أمريكا. في نيوزيلندا وجد شيلكوت وويجلى، (١٩٩٣) أنه بين ٦٠-١٠٠ % من عينات الأراضي المجموعة تحتوى على B.t. بدرجة تعتمد على المصدر.

الوجود في المجموع الخضرى للنباتات Phylloplane:

لقد ركزت القليل من الدراسات على الحدوث الطبيعى للباسيلليس فى المجموع الخضرى للنباتات. لقد قام Smith and Couche، وآخرون، (١٩٩١) بحصر المجموع الخضرى لأشجار الصنوبر ومتساقطة الأوراق ووجد أن عزلات B.t. تمثل ٣٠-١٠٠ % من مكونات الجراثيم التى توجد على أسطح الأوراق. لقد قام Ohba (١٩٩٦) بمعزل B.t. من أوراق شجر الستوت بينما قام Damgaard وآخرون (١٩٩٧-١) بمعزل B.t. من أوراق الكرنب لقد وجد جميع البحات مدى من العزلات لها نشاط أبادى ضد الحشرات من رتب حرشفية ونصفية وغمدية الأجنحة وقد اقترح أن B.t. تمثل جزء من الأحياء الدقيقة لمعظم النباتات. حديثا إتضح أن عزلات B.t. توجد طبيعيا فى المجموع الخضرى لأوراق النجيل فى المراعى.

الوجود الطبيعى لمرضات الحشرات:

لقد وجد أن B.t. نادرا ما تسبب إصابات وبائية طبيعية فى مجموع الحشرات. لقد اشار Vankova & Purrini (١٩٧٩) الى الوباء الطبيعى الذى حدث فى حشرات الحبوب المخزونة إيفستيا بأنواعها فى يوغوسلافيا بسبب B.t. بالرغم من أن هذه البكتريا لم تستخدم فى هذه المناطق على الإطلاق. لقد قام الباحثان بمعزل ١٨ سلالة بما فيها B.cercus وسلالات أخرى تنتمى إلى الأنواع السيروولوجية كورستاكى وموريسونى وثورنيجيسيز ولم ترد بيانات تفيد بوجود حشرات مصابة. فى الهند أشار راجاجوبال (١٩٨٨) أن ٦ ر ٥ - ٤ ر ٢٦ % من يرقات أبرو أريماموديكالا التابعة لحرشفية الأجنحة التى تقوم بنجر وعمل أنفاق فى أوراق الفول السودانى مصابة بال B.t. الوبائية. كانت الأصابة تنتشر بشكل أكبر فى المزارع المزدهمة للحشرات كما هو الحال مع ديدان الحرير. لقد وجد برجز وهارست (١٩٧٧) أن ثلثى مجموع حشرات حرشفية الأجنحة فى

المنسجات المخزونة تصاب بال B.t. عند مستوى منخفض. فى ٣٨/٢٠ عينات اليرقات التى جمعت ووضعت تحت نظام حجر دقيق فى المعمل لم تصبح العدوى بالـ B.t. ظاهرة حتى نمو الجيل الثانى أو الثالث تحت ظروف زحام شديد فى المزرعة المعملية. على غير المألوف فإن اليرقات التى ماتت خلال الوباء وجدت محتلة تماما بمستعمرات B.t. بعد الموت وكانت تحتوى على جراثيم وبلورات. هذه اليرقات كانت تحتوى على عديد من الجراثيم ١٠ لكل جثة Cadaver. لقد إتضح أن هذه الجثث كانت بيئة ممتازة للبكتريا B.t.

بالرغم من أن الوباء الذى يحدث بواسطة B.t. نادر الحدوث إلا أنه يوجد العديد من التقارير التى تشير الى العزل من الحشرات فى بعض الحالات تم عزل B.t. كواحد من أنواع عديدة من البكتريا التى وجدت على الجثث مع عدم وجود ما يدل على ماذا كانت سامة للعائل. مثال ذلك قام بانيزى وبنزوتى (١٩٨٨) بعزل عدد من البكتريا بما فيها B.t. من نحل العسل المصاب بالأكاروس. لقد تم الحصول على عزلات سليمة من الحشرات الميتة بدرجة تفوق البيئات الأخرى.

التدوير فى مجموع العائل Recycling in the host population

معظم الممرضات الحشرية تقتل العائل وتتضاعف فى الجثث ثم تنتقل لعوائل أخرى لتكرار الدورة. هذا بالرغم من أن B.t. فقير فى أحداث العدوى ومن النادر أن يحدث له تدوير. بينما الخلايا الخضرية والجراثيم تنتج فى الجثث فإن من النادر الإشارة الى أن B.t. تسبب وباء طبيعى. كيفية أحداث الفعل التى تعتمد كثيرا على التوكسين السام وليس العدوى قد ترجع الى نقص التدوير. جراثيم B.t. يمكن أن تبقى حية لسنوات طويلة فى التربة وفى الغالب يمكن أن تعزل من جثث الحشرات الميتة. لذلك فإن إعادة العدوى فى الحقل بعد التطبيق غير متوقعة ومن ثم يجب الرش السنوى بسبب نقص ثبات التوكسين.

دور بكتريا الباسيلليس فى البيئة:

يوجد العديد من النظريات عن الملائمة الأيكولوجية بواسطة البكتريا. على عكس معظم الميكروبات الممرضة للحشرات فإن B.t. عادة يحدث لها تدوير فقير ونادرا ما تسبب وبائيات طبيعية فى الحشرات مما يؤدي الى الاستنتاج بأن B.t. بالضرورة كائن دقيق مولده الأرض يملك نشاط أبدي على الحشرات (مارتن وترافرز، ١٩٨٩). حقيقة أن

B.t. يشيع وجودها في البيئة مستقلة عن الحشرات تعضد هذه الرؤية. لقد اقترح Meadows (١٩٩٣) أربعة تفسيرات ممكنة لوجود B.t. في التربة:

١- B.t. نادرا ما تنمو في التربة ولكنها تجد طريقها اليها وتستقر فيها بواسطة الحشرات.

٢- B.t. قد تكون غير فعالة على الحشرات المدفونة في التربة (هذا غير واضح حتى الآن)

٣- B.t. قد تنمو في التربة عندما تكون المواد المغذية متوفرة

٤- التوافق مع B. cereus. في المقابل اقترح سميث وكوخ (١٩٩١) أن B.t. عبارة عن مكون طبيعي لأحياء المجموع الخضري حيث يعيش في صورة تكافل أو تبادل مع النباتات بما يقدم الحماية ضد آكلات العشب. لقد تأكد هذا الحدس من انتقال B.t. في الغلاف الجوي كما ثبت من وجودها في العينات التي أخذت من العمق في أواني ثلجية قبل إجراء عمليات مكافحة الآفات.

الإنتاج وتجهيز المستحضرات Production and formulation

منتجات B.t. عادة تحصى على مخلوط من الجراثيم وبلورات الأندوتوكسين والخلايا الخضرية وكناسة الخلايا وبعض المواد المتخلفة من التخمر بالإضافة لعدد من مكونات المستحضر التي تضاف بغرض زيادة كفاءة المستحضر على الانتشار على الأوراق والثبات وطول فترة الثبات في التخزين أو سهولة التطبيق. لقد ظهر مايزيد عن ١٠٠ سم في المراجع منذ ظهور المستحضر التجاري الأول عام ١٩٣٨. غالبية المنتجات كانت مبنية على الأصناف السيرولوجية لبكتريا B.t. كورستاكي ، ثورينجينيسيز وأسرائيلينيسيز وإيزاواي. مكونات أى منتج B.t. يحتاج لتقييم منفرد للحكم على الأمان البيئي لأن هذه المكونات من الخصائص المميزة للمستحضرات ذات الحساسية. من غير المستحب أن مكونات المستحضر تختلف عما هو منشور في التجارب وقد نشرت القليل من المشاكل عن هذه المكونات. وكالة حماية البيئة الأمريكية USEPA وغيرها من الهيئات التشريعية المماثلة في الدول الأخرى أعلنت عن عدد من مستحضرات B.t. حالة بحالة ولو أن مانشر عن الأمان قليل.

الإنتاج Production : المادة الفعالة لكل منتج B.t. بوجه عام يصنع باستخدام عملية تخمر قياسية كما وصف بواسطة بيرجي وجون، (١٩٩٨). خلال التخمر وفي البداية تتضاعف B.t. فى المرحلة الخضرية. عندما يصبح المادة الغذائية حرجة أى تقل بشكل حرج تبدأ B.t. فى التجثثم وبعد ذلك تتحلل الخلايا لتحرير الجراثيم والبروتينات البلورية التى تنتج خلال مرحلة التجثثم. بعد ذلك يتم تركيز المادة حتى الجفاف أو تخلط مع المواد الخاملة فى صورة سائلة ثم تعبأ. لقد أثارت وكالة حماية البيئة الأمريكية EPA وغيرها من الوكالات حول العالم القلق والمخاوف والأهتمام حول احتمالية إنتاج توكسينات خارجية للباسيليس غير مرغوبة لأن تخليقها يبدو أنه يعتمد على نواحي لا يمكن التنبؤ بها فى عملية التخمر سواء بالنسبة لتركيب وسط التخمر أو ظروف النمو المستخدمة فى الإنتاج. لقد أوضح Mohd salleh وآخرون (١٩٨٠) أن أنشطة التوكسينات الخارجية من ثلاثة أصناف B.t. تنمو فى ستة أوساط تخمر مختلفة تختلف من وسط لوسط كما أنه توجد نباتات فيما بينها حتى لو نمت على نفس البيئة.

التوكسينات قد تكون توكسينات مخفزة inducible مع تخليق يعتمد على وجود بعض الكيمائيات . كما أنها قد تكون نواتج تمثيل سامة أو تتطلب وجود بعض الكيمائيات كى تتم عملية التخليق أو أن تخليقها معتمد على معايير النمو الطبيعية مثل درجة الحرارة لذلك فإن اختبار قطعة من الإنتاج وكل إنتاج يتطلب الإجراء بدقة وحرص للكشف عن هذه التوكسينات ومدى تلوثها بالبكتريا المرضية للتدبيات إذا أخذ فى الاعتبار الأمان البيئى لمكونات المستحضرات والنواتج النهائية فإن الرجوع الى النظم وأحكام EPA فى أمريكا يكون مفيدا للغاية جزئيا بسبب أن العديد من التقييمات متاحة للعامة كما أن العديد من الدول مزجت نظم التقويم الخاصة بها فى ظل الأسترشاد بدلائل EPA و/ أو تمرير البيانات المقبولة بواسطة EPA. مثال ذلك أن EPA يعتقد أنها تعمل على تقليل الخطر الذى قد ينجم من وجود التوكسينات الخارجية فى المنتج النهائى خلال الإنتاج عن طريق وضع طلبات جديدة فى نظام التسجيل (EPA، March، ١٩٩٨). الشركات التى ترغب فى تسجيل منتجاتها يجب أن تتوخى وتتبع العمليات القياسية فى التصنيع بما يكفى لمنع إنتاج الكميات الكبيرة من التوكسينات الخارجية. أمان المنتجات يجب أن يتأكد من خلال إجراء اختبارات على قطعات الإنتاج باستخدام الطرق الموضوعة مثل الحقن تحت الجلدى لواحد مليون جرثومة على الأقل فى كل فار من خمسة واختبار السمية على يرقات الذباب أو الكشف عن البيتا - أكتوتوكسين بجهاز HPLC (EPA، ١٩٩٨، ص ٣٨ - ٣٩).

هناك مقدرة للسلاسل B.t. لإنتاج البيتا - أكسوتوكسين خلال النمو المتتابع في المستحضرات النهائية بالرغم من عدم الكشف عنها في قطرات الإنتاج. ليكن معلوما أن السلالة ذات المقدرة على إنتاج البيتا - أكسوتوكسين يجب أن تكون محتوية على الجينات التي تشفر الأكسوتوكسين. إذا كانت السلالة المستخدمة قادرة على إنتاج البيتا - أكسوتوكسين فإن الوكالة EPA تطلب من المنتج التأكد من عدم وجود توكسين في المادة الفعالة. بالإضافة إلى ذلك فإن المنتج يجب ألا يوضع في وسط يشمل نواتج نهائية كمستحضرات تسمح بالإنبات و/أو النمو في أي وقت قبل التطبيق. المنتج النهائي يجري عليه اختبارات للكشف عن الأكسوتوكسينات من خلال التقييم الحيوي ضد الدافنيا مع استخدام أقصى جرعة ضارة ولو أن طرق أخرى تم تطويرها.

الأمين البيئي لمكونات مستحضرات B.t.:

مكونات المستحضرات :

منتجات B.t. تحتوي على نسبة مئوية كبيرة من البكتريا ووسط التخمر كما أن المواد الإضافية تستخدم في الغالب لتحسين ثبات المستحضر وتحقيق الصفات المطلوبة مثل الانسيابية في الماء Flowability. مستحضرات المبيدات تحتوي على أسرار ولكن للحصول على الموافقة بالتسجيل يجب أن تقدم هذه الأسرار للسلطات المعنية بالتشريع. حيث أنه توجد اختلافات بين مستحضرات B.t. فإن أمان مركب أو مستحضر ما لا تنعكس على أمان الآخرين. العديد من الشركات تستخدم المواد الفعالة التي تظهر في قائمة معروفة في أمريكا والتي عرفت بأنها آمنة بوجه عام generally recognize as safe (GRAS). لقد تم توصيف الأمان لهذه المواد الفعالة بواسطة هيئة الغذاء والدواء FDA وعرفت بأنها آمنة عندما تستخدم كمواد إضافية مباشرة للغذاء والتي تسمح للشركات بتجنب السمية الزائدة وأجراء الاختبارات الخاصة على المستحضرات النهائية. اختبارات السمية على المادة الفعالة التي لم تجهز مستحضراتها مازالت مطلوبة.

مكونات المواد الإضافية والمستحضرات النهائية يمكن أن تؤخذ في الاعتبار عند مراحل متعددة خلال العملية ولأسباب متعددة. لقد عدد بيرجيز رجونز (1998) عدد من المواد الإضافية التي تستخدم من B.t. بما فيها المواد النائرة والحاميات من الجفاف مثل الصمغ العربي واللاكٹوز. إضافة أيونات الكالسيوم Ca^{+2} استخدمت لترسيب البيتا -

أكسوتوكسينات. بعد التخمير يمكن استخدام المواد الإضافية في المنتجات لتحسين التخزين والثبات وكفاءة الانتشار والتطبيق. لقد استخدمت مستحضرات مختلفة من B.t. على الحشرات المستهدفة في أماكن المعيشة المختلفة أو حيث يكون للأنواع المستهدفة عادات تغذية مختلفة. مثال ذلك المحبيات والكبشولات والمستحضرات السائلة التي تعتمد على تحت الأنواع مثل B.t. كورستاكي واسرييلينيسيز. لقد تم تطوير مستحضرات خاصة للتطبيق في الماء. مثال ذلك عندما تكون يرقات البعوض المستهدفة تتغذى في الأعماق وكذلك على أسطح الماء أو تتغذى على طول عمود الماء.

لقد تم تجهيز مستحضر B.t. كمساحيق جافة مع بودرة التلك (مادة حاملة) ومسحوق السليكا (مادة إنسابية) ومحببات الصلصال مع مواد لاصقة ومحببات قابلة للانتشار في الماء (نشا الذرة أو الجينينية أو سوانل في أساس الجيل). بالنسبة للرش تضاف الزيوت والمواد التي تضيف سمك. حوالى نصف منتجات B.t. الموجودة حالياً عبارة عن مستحلبات زيت في الماء (بيرجز وجونز ، ١٩٩٨). من الناحية التقليدية تشمل مركبات B.t. القابلة للانسباب في الماء مواد التخمير الصلبة (مع جراثيم وبللورات B.t.) والمواد الناشرة و مواد التعلق (مثل الصمغ) والمواد التي توقف النمو الخضرى للفطريات بشكل مؤقت Fungistatic والمواد التي توقف نمو البكتريا bacteriostati والماء بينما المركبات القابلة للانسباب ذات الأساس الزيتي تحتوى على المسحوق النقى والمادة الحاملة (زيت) ومادة التعلق (نبتونيت) ومادة منشطة (كربونات البروبيلين).

لقد استخدمت المواد الإضافية للمستحضرات لتحسين كفاءة منتجات B.t. بالنظر الى تغطية المادة المرشوشة لسطوح الأوراق النباتية ومقاومة المطر المنهمر. المواد ذات الجذب السطحي surfactants تحسن من التغطية على الأوراق الكارهة للماء وتسهيل خلط الجراثيم المقاومة أو الكارهة للماء وبللورات التوكسين في الماء وتكوين مستحلب بين الزيت والماء عن طريق تقليل الجذب بين السطحي. لقد وجد ستفين وآخرون، (١٩٩٤) أن سيلويت - أل - ٧٧، المادة الجاذبة سطحيا السليكون العضوى تزيد من كفاءة B.t. فى حماية الحاصلات البستانية. المواد اللاصقة تحسن من الثبات ضد المطر حيث أن التوكسينات والجراثيم تغسل من على الأوراق مما يقلل من نقص الثبات. كذلك تضاف المواد التي تحجب أشعة الشمس sunscreens الى مستحضرات B.t. لأن التعرض للأشعة فوق البنفسجية ULV يقلل من الثبات. التأثيرات الضارة لبعض مضافات المستحضرات ذات اهتمام كبير. مثال ذلك أن المواد السطحية غير الأيونية المسماة

أجزال، كليتويت، DX، تاب في المحلول المائي عند مستوى ١٠ جزء في المليون تؤثر على أنسبات بذور ونمو السورجم (Horowitz، ١٩٧٧). يفضل استخدام زيوت الخضر بدلا من الزيوت المعدنية لأنها أقل أهداا للضرر على النباتات (بيرجز وجونز، ١٩٩٨).

لقد أختبرت كفاءة منشطات التغذية خلطا في التناك مع منتجات B.t. لزيارة تناول التوكسينات والجراثيم. لقد استخدم المولاس والسكريات والذرة ونخالة القمح وبعض منشطات التغذية المتاحة (كواكس، فيسيت، جاستو، أنتيك) فارار وريدجواي - ١٩٥٥ - (١). لقد وجد باتى وكارنر، (١٩٧٤) أن الديبيل كان أكثر فعالية ضد ديدان اللوز الأمريكية عند أضافته لطعوم منشطة التغذية. لقد قام سلامة وآخرون، (١٩٨٥) بفحص كفاءة منشطات التغذية مع B.t. entomocidus ضد دودة ورق القطن باستخدام مستخلصات من بعض النباتات (مولاس - دقيق فول صويا - دقيق بذرة القطن - سكروز). لقد وجد أن العديد من المركبات مثل المولاس والسكرور زادت من فاعلية B.t. من جراء زيادة تناول التوكسينات. لقد وجد أن كثير من المواد تنشط B.t. لقد سجل بيرجز وجونز ١٩٩٨ الأحماض الأمينية والمواد الجاذبة السطحية والأملاح غير العضوية والأحماض العضوية وأملاحها والمركبات الفينولية ومثبطات البروتين والمواد المذيبة للبروتينات وحامض الأسكوربيك والكافين وديمثيل سلفوكسيد ودائ سيكلاميد وحامض ديبيكولينيك وبروتين إنهانسين من فيروس جرانيولوزيس والنيمازال-تى، حامض الساليسيليك، حامض أمينوساليسيليك، وحامض سوربيك. درجة التأثير التنشيطى وصلت ٥×١ مرات زيادة فى الفاعلية ولكنها وصلت ٤٠ مرة فى بعض الحالات. لقد ظهر كذلك أن المبيدات الكيميائية تزيد من فاعلية B.t.

الأمان البيئى:

التأثير البيئى لمكونات مستحضرات B.t. يصعب تقييمه لحد كبير بسبب طبيعة المكونات ونقص المنشور عن الفعل المستقل لكل من هذه المكونات كما ذكر قبل. لقد فصلت العديد من الدراسات بين سمية مكونات المستحضر عن سمية توكسينات B.t. والجراثيم. فى نيوزيلندا أصبح هذا الوضع محل تناول عندما اقترح استخدام B.t. كورستاكى (رييل) فى حملة استئصال الوباء الناجم عن أورجيا تيلينا فى أماكن سكنى الحضر. لقد شملت الحملة الرش المكثف فوق مدن نيوزيلندا بالطائرات حيث أخذ فى الاعتبار مكونات المستحضرات بشكل ضرورى. لقد كان المنتج رافضا لاستخدام مكونات

مستحضرات حساسة بشكل تجارى. لقد خلص الجميع الى انه كلما اقتربت المستحضرات من عامة الناس كلما زادت الحاجة لتحقيق وضمان الأمان. لغرض التسجيل كانت تعلن مكونات المستحضر بشكل سرى للغاية فى ظل إتفاقية مكتوبة كما يجب تقديم كل البيانات الخاصة بالأمان.

لقد أشارت بعض التقارير أن السمية على النحل والفئران كانت ترجع جزئيا الى المواد الحاملة فى المستحضرات الأولية (Forsberg وآخرون ، ١٩٧٦). ولو أن التقارير أشارت الى أن البيتا - توكسينات توجد فى المستحضرات ولم يكن من الممكن فصل تأثيراتها. لقد أشارت العديد من الدراسات الى أمان مكونات المستحضرات لمركب الدايبيل. لقد قام Haverty ، (١٩٨٢) بدراسة سمية المادة الحاملة للدايبيل 4L ضد المفترسات والطفيليات. دايبيل ٤ - ال معلق قابل للاستحلاب غير مائي للباسيلليس كورستاكى وكان هناك اهتمام حول سمية الزيت بعد التغيير من استخدام المستحضرات المائية الى تلك التى تبني على الزيت. الموت الذى يتسبب من الحامل لايزيد عن ١ ، ٢% على أى من الأنواع غير المستهدفة عند معدل ٤ ، ٩ لتر/هكتار. عندما استخدم بمعدل ٧ ر ١٨ لتر/هكتار كانت نسبة موت المفترسات الكاملة كريزوباكارينا ، هيبوديميا كونفرجينيز أعلى من المقارنة ولكن ذلك لم يحدث مع الطفيل أفيتيس ميلنس. لم يزداد الموت عن ٤ ر ١٣% لأى نوع. فى دراسة أخرى وجد هولمز (١٩٩٥) أنه عندما كانت B.t. كورستاكى غير المجهزة والدايبيل المائي بدون تأثير على الكولومبولا والفولسوميا كانيدا كانت مستحضرات الدايبيل الزيتية ذات تأثيرات سلبية. لقد أدى ذلك الى الاقتراح بأنه توجد سمية مباشرة أو غير مباشرة لمكونات المستحضر. على نفس المنوال وجد أديسون وهولمز، (١٩٩٦) أن ١٠٠ ضعف فى التركيز البنى للدايبيل ٨ إلى قليل من بقاء ونمو وأنتاج شرانق دودة الأرض فى الغابات ولم يحدث هذا التأثير من الباسيلليس كورستاكى أو الدايبيل المائي 8 AF .

المنتجات Products:

منتجات B.t. تمثل ٩٠% أو مايزيد من المبيدات الحيوية التى تباع على مستوى العالم فى الوقت الراهن (سواندر، ١٩٩٤). العديد من المنتجات (مثل ديبيل وثوريسيد وبيوبيست) تبني على B.t. كورستاكى HD-1 وهى السلالة القياسية بسبب النشاط ضد مايزيد عن ١٠٠ نوع من الحشرات حرشفية الأجنحة (نافون ، ١٩٩٣). لقد تم وضع قوائم تحتوى على ١٦٧ نوع من حرشفيات الأجنحة حساسة للدايبيل. هناك منتجات أخرى

مبنية على سلالات B.t. مع مدى واسع من العوائل الأكثر تخصصا وهي ذات أسواق محدودة. بسبب الأهتمام عن السمية على الثدييات فإن العديد من المنتجات من الاتحاد السوفيتى سابقا ودول الكتلة الشرقية التى تبنى على الطرز الميكروولوجى تحتوى على الغالب على مايزيد عن ٢٠% أكسوتوكسين (نافون، ١٩٩٣).

لكى نفهم ماهو منشور فى الدراسات المرجعية يفضل الربط ما بين اسم المنتج وتحت النوع أو الصنف. الجدول (١-٣) يوضح الأسماء التجارية والآفات المستهدفة والشركة المنتجة وبلد المنشأ:

جدول (٣-١): الأسماء التجارية وتحت الأنواع في بكتريا B.t. والآفات المستهدفة والأصل.

| Subspecies/product | Target pest | Company country of origin |
|---------------------|-------------|-----------------------------------|
| Kurstaki | | |
| Astur (asporogenic) | Lepodoptera | Bushkovskaya et al 1994 |
| Bacilan | Lepodoptera | Lonc et al 1986 |
| Bactec bertan B.t. | Lepodoptera | Bactec corporation |
| Bactospeinel | Lepodoptera | Abbott: Starnes et al 1993 |
| Bactucide | Lepodoptera | Switzerland: Triggiani& |
| Baktur | Lepodoptera | sidor 1982 |
| Bathurim | Lepodoptera | Scalco et al 1997 |
| Bioasp(asporogenic) | Lepodoptera | Slovakia: Novotny& Svestka 1986 |
| Biobit | Lepodoptera | India:Satapathy&panada 1997 |
| Biodart | Lepodoptera | Abbott: starnes et al 1993 |
| Biolep(sporogenous) | Various | ICI Canada: Bemier et al 1990 |
| Biotrol2 | Lepodoptera | India: Satapathy & Panada 1997 |
| B.t. Turex | Lepodoptera | Bishop et al 1973 |
| Condor | Lepodoptera | Spain: Cortes& Borrero 1998 |
| CoStar | Lepodoptera | Ecogen: Starnes et al 1993 |
| Crymax | Lepodoptera | Thermo trilogy: Shah&Goettel 1999 |
| Cutlass | Lepodoptera | Ecogen:Shah& goettel 1999 |
| Delfin | Lepodoptera | Ecogen: Starnes et al 1993 |
| Dipel3 | Lepodoptera | Thermo: Trilogy |
| Foray | Lepodoptera | Abbott: Shah &Goettel1999 |
| Futura | Lepodoptera | Abbott: Shah &Goettel1999 |
| Javelin | Lepodoptera | Abbott: Starnes et al 1993 |
| Lepidocide | Lepodoptera | Thermo trilogy: Shah&Goettel 1999 |
| Lepinox | Lepodoptera | Goral et al 1984 |
| Manapel | Lepodoptera | Ecogen: Shah & Goettel 1999 |
| Mattch | Lepodoptera | Brazil. Cnv 1977 |
| MVP4(Cry 1 Ac) | Lepodoptera | Myeogen |
| MYX4(Cry 1 Ab) | Lepodoptera | Myeogen Nyouki et al 1996 |
| Novabac | Lepodoptera | Myeogen Nyouki et al 1996 |
| Novosol | Lepodoptera | Randall et al 1979 Abbott |

تابع جدول (١-٣): الأسماء التجارية وتحت الأنواع في بكتريا B.t. والآفات المستهدفة والأصل.

| Subspecies/ Product | Target pest | Company, country of origin or reference |
|---------------------------------------|------------------------|---|
| Kapax | Lepidoptera | D'-Offria <i>et al.</i> 1996 |
| Raven ³ | Coleoptera | Ecogen; Shah & Goettel 1999 |
| Safer | Lepidoptera | Home Harvest, http://homeharvest.com/bt.htm |
| SAN415 | Lepidoptera | Hegazy & Antounious 1987 |
| Suk-Bi | Lepidoptera | Reigart & Roberts 1999 |
| Tuarow ⁶ | Lepidoptera | Japan; Wysoki <i>et al.</i> 1986; Navon 1993 |
| Thuricide 3, 7 | Lepidoptera | Thermo Trilogy; Shah & Goettel 1999 |
| Tribacter | Lepidoptera | Netherlands; Nef 1972; Reigart & Roberts 1999 |
| Wormbuster | Lepidoptera | Dactec; Starnes <i>et al.</i> 1993 |
| Zucamp | Lepidoptera | Brazil; Habib 1986 |
| Fluvidosulre BTR (- sulfur) | Lepidoptera & mildew | France; Goebel <i>et al.</i> 1997 |
| Uacilex (+ aizawa) | diamondback moth | Kimura 1991; Asano & Seki 1994 |
| Agree (+ aizawa) | diamondback moth | CIBA-GEIGY; Ivey & Johnson 1997, 1998 |
| Uacilis (+ aizawa) | torricids | France; Fougeroux & Lacroze 1996 |
| <i>aizawai</i> | | |
| Xentari/Zentari/Centari | Lepidoptera | Abbott; Shah & Goettel 1999; most of the world/Japan/Thailand |
| Certan | wax moth/Lepidoptera | Sandoz; Starnes <i>et al.</i> 1993 |
| Clorbac | Lepidoptera | Federici 1999 |
| Design WSP | Lepidoptera | Mascarenhas <i>et al.</i> 1998 |
| Florbac | diamondback moth | Abbott; Starnes <i>et al.</i> 1993 |
| Quark | | Abbott |
| Selectzin | Lepidoptera | Poland; Lipa <i>et al.</i> 1977; Takaki 1975 |
| Turex | Lepidoptera | Thermo Trilogy; Shah & Goettel 1999 |
| <i>bruelensis</i> | | |
| Acroba | Mosquitoes/ Blackflies | American Cyanamid; Starnes <i>et al.</i> 1993 |
| Aquabac | Mosquitoes/ Blackflies | Reigart & Roberts 1999 |
| Bactimos | Mosquitoes/ Blackflies | Abbott; Shah & Goettel 1999 |
| Bactinulicide | Mosquitoes/ Blackflies | USSR; Kanybin 1991 |
| BMC WP | Mosquitoes/ Blackflies | Reuter |
| Bulmoscud | | Halkova <i>et al.</i> 1993 |
| Cybate (Aust. label) | Mosquitoes/ Blackflies | Cyanamid |
| Duplex (+methoprene) | Mosquitoes/ Blackflies | Zuccon - PPM |
| Guarol | Fungus goats | Abbott; Starnes <i>et al.</i> 1993 |
| JieJueLing preparation | Mosquitoes/ Blackflies | China; Shah & Goettel 1999 |
| JieJueLing preparation (+ strain CS8) | Mosquitoes/ Blackflies | China; Shah & Goettel 1999 |
| Skeetal | Mosquitoes/ Blackflies | Abbott; Chang <i>et al.</i> 1990 |
| Teknar | Mosquitoes/ Blackflies | Thermo Trilogy; Shah & Goettel 1999 |
| Vectobac | Mosquitoes/ Blackflies | Abbott; Shah & Goettel 1999 |
| <i>tenebrionis</i> | | |
| Fun | Coleoptera | Ecogen; Starnes <i>et al.</i> 1993 |
| M-Trak ⁵ | Coleoptera | Mycon; Starnes <i>et al.</i> 1993 |
| M-One | Coleoptera | Mycon; Starnes <i>et al.</i> 1993 |
| Navador | Coleoptera | Abbott; Shah & Goettel 1999 |
| Novulji | Coleoptera | Abbott; Panetta 1989 |
| Tindem | Coleoptera | Sandoz; Starnes <i>et al.</i> 1993 |

تابع جدول (١-٣): الأسماء التجارية وتحت الأنواع في بكتريا B.t. والآفات المستهدفة والأصل.

| Subspecies/ Product | Target pest | Company, country of origin or reference |
|--|-----------------------------------|---|
| Muscabac (+exo) | Diptera | Finland, USSR; Powell <i>et al.</i> 1990; Pinnock & Milner 1994 |
| Parasporin | Lepidoptera | Grain Processing Corp., USA; Forsberg <i>et al.</i> 1976 |
| Tarmik | Lepidoptera | Turkey; Tutkun <i>et al.</i> 1987 |
| Thiodane | Diptera | Farghal <i>et al.</i> 1987 |
| Thuridan | Lepidoptera | Poland; Glowacka-Pilot 1984 |
| Thuringin (+exo) | Various | Tonkonozhenko 1981 |
| Toxobacterin | Lepidoptera | USSR; Spektor & Vykhovets 1975; Malokhasova 1979 |
| ("Insectin enriched with Enzotoxin [sic]") | | |
| <i>alesti</i> | | |
| BIP ⁹ | Lepidoptera | Daricheva <i>et al.</i> 1983; Goral <i>et al.</i> 1984 |
| Alestin | Lepidoptera | USSR; Mitrofanov & Novozhilov 1982 |
| Anidal | Lepidoptera | Creighton <i>et al.</i> 1972 |
| <i>gullerinae</i> | | |
| Emobakterin | Lepidoptera | USSR; Rimmington 1989 |
| Qing-Chong-Jun No. 6 (+cypermethrin) mites | | China; Dong & Niu 1991 |
| Spicturin | <i>Plutella</i> spp. | India; Shah & Goettel 1999 |
| <i>cucasicus</i> 10 | | |
| BIP ⁹ | Fleas, Lepidoptera | USSR; Afrikyan & Chil Akopyan 1980 |
| <i>chinesensis</i> | | |
| Shuangdu preparation | Lepidoptera, Coleoptera & Diptera | China; Shah & Goettel 1999 |
| <i>darmutadiensis</i> | | |
| Bacicol | Coleoptera | USSR; Kandybin & Smirnov 1996 |
| <i>dendrolimus</i> | | |
| Dendrobacillin | Various | USSR; Rimmington 1989 |
| <i>sotto</i> | | |
| Cellistart | Lepidoptera? | Japan; Takaki 1975 |
| Subspecies not stated | | |
| Bitayon | Lepidoptera | Israel; Shah & Goettel 1998 |
| USU10, Rijin | Lepidoptera | China & Malaysia; Shah & Goettel 1999 |
| Capab | Lepidoptera | India; Srivastava & Nayak 1978 |
| Dibela/SAN (+exo) | Acari & Hemiptera | Grau 1987; Williams <i>et al.</i> 1987 |
| Disparin | Lepidoptera | Bulgaria; G'onev 1977 |
| Halt | Lepidoptera | Wockhardt, India; Lal & Lal 1996 |
| Junduwei (+HaNPV) | <i>Helicoverpa armigera</i> | China; Zhang <i>et al.</i> 1996 |
| Miazol (+exo) | Myiasis in animals | Tonkonozhenko <i>et al.</i> 1977 |
| Plantibac | Lepidoptera | Mineo 1970 |
| Shachongjin | Coleoptera, Lepidoptera & Diptera | China; Lin <i>et al.</i> 1990a,b |
| Spareine | Lepidoptera | France 1938 (first Bt product) Lambert & Peferoen 1992 |
| Subdu (+ <i>B. subtilis</i>) | Diptera | Campbell & Wright 1976 |
| Tarsol | Lepidoptera | Krice 1978 |
| Thurminox | Mites & Lepidoptera | Ilseu 1980 |
| Thuringin | Diptera | Yarnykh & Tonkonozhenko 1975 |
| Ybi-1520 | Lepidoptera | China; Shah & Goettel 1999 |

الباب الثاني

**تأثيرات بكتريا الباسيلليس على الحشرات والميكروبات
واللافقاريات والفقاريات غير المستهدفة في البيئة**

تأثيرات بكتريا الباسيليليس على الحشرات والميكروبات واللافقاريات والفقاريات غير المستهدفة في البيئة

مقدمة وتقويم للفصول الثلاثة:

لقد مر الباب الاول بسهولة ويسر وفى وقت قصير بسبب تلهفى لمعرفة المزيد عن هذا النبع والمصدر الدائم والكريم والمستمر الطبيعى للحصول على مستحضرات من الطبيعة خاصة من الارض تحتوى على مواد فعالة تبيد الحشرات مع اعتقاد العامة والخاصة بالامان المطلق لهذه البكتريا على الانسان والبيئة والكائنات غير المستهدفة. لقد خرجت من استعراض الباب بامكانية وعدم صعوبة الحصول على هذه الوسيلة الفعالة التى يمكن ادخالها بشكل مدروس وعقلانى فى برامج الأدارة المتكاملة للآفات الحشرية. لقد تأكدت فى وجود الاف من السلالات فى بنوك خاصة على مستوى العالم كما هو الحال مع بنوك الاصول الوراثية. يستتبع ذلك سعادتى بالنجاح فى الحصول على العديد من السلالات المصرية الاصل والتى امكن عزلها من البيئة المصرية الغنية ليس بالعدس والفول والغذاء بل والكائنات الدقيقة النافعة بواسطة زملاء الخبراء فى معهد بحوث الهندسة الوراثية بوزارة الزراعة. لقد اصبحت على دراية بسبل الحصول على سلالات بكتريا الباسيليليس من البداية وحتى الان فى الدول المختلفة واسس التعريف والتوصيف وتحديد الخصائص والمواصفات لكل سلالة ناهيك عن طرق العزل والتصنيف والتنمية. اذا كانت الباسيليليس تمثل ما يزيد عن ٩٠% من المبيدات الحيوية فانها تستحق معرفة كل ما يحيط بهذه الوسيلة فى مكافحة الآفات وطرق التطبيق. لقد اثر فى جدا امكانية استخدامها بالطائرات بالرش الجوى فوق المدن المأهولة بالسكان دون خوف من اية اضرار على الانسان والبيئة. لقد كان ما تم جمعة من دراسات مرجعية عن المواد السامة او التوكسينات الداخلية وهى الفعالة ضد الحشرات ذات الامان النسبى العالى وما يقابلها من التوكسينات الخارجية بيتا عديمة التأثير على الحشرات والتى لها اضرار لا يمكن انكارها على الانسان ومن ثم تكون هناك ضرورة ملحة لتتقى المستحضرات بحيث تكون خالية من التوكسينات الخارجية وهذا ليس بالامر السهل او الهين. كذلك تناولت الدراسات المرجعية دور الجراثيم والبلورات التوكسينية فى احداث الفعل والتاثيرات على الحشرات المستهدفة والكائنات الاخرى غير المستهدفة. اشارت الدراسات المرجعية الى اهمية الوسائل الفينولوجية والسيرولوجية وتلك التى تعتمد على الجامض النووى "الدنا" وتفاعل

سلسلة البوليميريز PCR وجامض الدنا الريبوسومي ومقارنة الكروموسومات في التعرف على الباسيليس وتوصيفها ثم جاء الدور على تناول التوكسينات الخارجية والداخلية وكيفية احداث الفعل لكل منها الخ.

الفصل الاول

السمية على الحشرات Toxicity to insects

الاختلافات بين السلالات وما بين طرق التقييم الحيوى وصعوبة تقدير المكونات الفعالة لبكتريا Bt ومستحضراتها بالاضافة الى التأثيرات البيئية والعائلية على السمية .. كل ذلك اشترك فى تعقيدات تقويم سمية الباسيلليس على الحشرات وتحديد التأثيرات الممكنة على الاحياء والكائنات غير المستهدفة. لا يوجد طرز سيروولوجى فعال ضد واحدة فقط من رتب الحشرات. لقد اشارت التقارير الاولى عن Bt انها متخصصة على حشرات حرشفية الاجنحة ، ولكن مع توالى الاستكشافات عن سلالات جديدة تاكد ان Bt ذات مدى واسع من النشاط حيث اظهرت السلالات سمية على ما يزيد عن ٣٠٠٠ نوع تتبع ما يزيد عن ١٦ رتبة من الحشرات. لقد امكن وضع بعض التعميمات فيما يتعلق بالمدى العائلى: الباسيلليس كورستاكي ، ايزاوايا ، ثورينجينسيز ، اليسى ، دندروليمس / سوتو (سامة ضد حرشفية الاجنحة) ، باسيلليس Bt اسراييلينسيز ، دارمستارينسيز (ثنائية الاجنحة) ، Bt تينبيريونيز وجابونسيز (غمدية الاجنحة). حيث ان تعريف تحت انواع Bt مثل الصنف السيروولوجى تستخدم للتنبؤ بنظام التوكسين فى السلالات فان حساسية العائل لا يمكن استخدامها او تقريب معرفتها باستخدام الصنف السيروولوجى والتقسيم كمجاميع.

تتحقق التخصصية بواسطة الدلتا - اندوتوكسين لوحدها ومخلوط الاندوتوكسين فى العزلة الفردية وهذه قد تتداخل لزيادة (تنشيط) واحيانا انقاص السمية على حشرة معينة. فى بعض الحالات فان الجراثيم تزيد كذلك من كفاءة مستحضرات Bt. نوع المستحضر قد يؤثر على مدى وتنوع النشاط فقد وجد ان المستحضرات المختلفة من نفس السلالة تظهر اختلافات تصل لعشرة امثال فى السمية خلال تجارب التقييم الحيوى المقارن. لقد شغلت مقارنة سمية سلالات Bt اهتمام العديد من العلماء لدرجة انه تم وضع مقاييس دولية لمستحضرات الباسيلليس كورستاكي واسراييلينسيز. مازالت هناك صعوبات فى وجدة المقارنة بين طرق التقييم الحيوى والحشرات المختلفة والعديد من الوحدات التى تستخدم للتعبير عن المواد الفعالة. كل من سلالات الباسيلليس فعالة ضد عدد محدود من انواع الحشرات وفى الغالب تكون فعالة ضد قليل من رتب الحشرات فقط تحت الظروف المختلفة. فى المعمل قد تكون بعض الحشرات والكائنات الحية الاخرى حساسة فقط مع الجرعات العالية جدا. التقارير عن الحساسية لمستحضر الديبيل تفيد فى المقارنة لانها

مبنية على سلالة فردية لسنوات طويلة متعددة حيث اظهرت سمية قليلة في الحقل على افراد من حشرات حرشفية الاجنحة وكان هناك تحمل نسبي لعدد من المفترسات والطفيليات التابعة لرتبة حرشفية الاجنحة.

لقد تم تسجيل حشرات غير حساسة في ١١ من الرتب التي تحتوى على انواع حشرية حساسة. لقد وجدت اختلافات في داخل النوع في اتجاه حساسية الحشرات للبكتريا Bt حتى مع استخدام مركب واحد. بينما تظهر العديد من الحشرات حساسية في المعمل فان نفس الحشرة قد لن تتأثر تحت ظروف الحقل. الاختلاف بين الحساسيات في المعمل والحقل قد ترتبط بالجرعة ومستوى التعرض وسلوك التغذية وايكولوجيا الحشرة او خليط من كل هذه العوامل. من العوامل الاخرى مثل ثبات Bt قد تقلل من تأثير الباسيلليس في الحقل.

تقييم السمية على الحشرات Assessing toxicity to insects

فهم سمية Bt:

كما ذكر سابقا فان سمية Bt تعتمد على نوع التوكسينات والجراثيم والتي تعبر عنها في كم العزلات والتي يمكن تجهيزها بواسطة طرق عديدة بما فيها الاثبيجات (اصناف سيرولوجية). تتميز السمية المتعددة لمختلف تحت الانواع والتوكسينات التي تنتج بواسطة Bt ضروري لفهم حدود الفصل الابدائي ضد الحشرات وتقويم الخطورة على الكائنات غير المستهدفة. من الصعوبات التي تجابه تقييم الامان البيئي او حتى فهم توكسيكولوجيا Bt يتمثل في الاتفاق على الاصطلاحات المرتبطة بال Bt وهي الاصناف وتحت الانواع والاصناف السيرولوجية والتوكسينات والمستحضرات النهائية ولو انها جميعا استخدمت دون تقييد في التعريف لوصف وحدة العنقوانية. في العديد من الحالات عندما يستخدم منتج خاص او تحت نوع خاص فان التوكسينات الواقعية التي تسبب النشاط ضد الحشرات ليست متماثلة تماما ولم تعرف. لذلك فانه من الصعوبة البالغة مقارنة النشاط الخاص للباسيلليس من خلال المراجع. هناك صعوبة اضافية تتمثل في ان مدى واسع من الطرق قد استخدم لتقييم الكفاءة. دور الجراثيم في الكفاءة متفاوت حيث ان بعض الدراسات اشارت الى الفعل الابدائي على الحشرات عندما توجد الجراثيم عنه في حالة وجود المستحضرات البلورية. في العديد من الحالات لم تساهم الجراثيم بشكل معنوي في كفاءة باسيلليس Bt.

استخدام السلالات المرجعية:

صعوبة المقارنة بين العزلات وتوكسينات Bt أصبحت ظاهرة خلال الفترة ١٩٦٠-١٩٧٠. كما أشار Dulmage وآخرون (١٩٨١) فأنه يستحيل من الناحية العملية ان تستكرر بشكل متطابق ظروف التحليل الحيوى لتقدير التركيزات النصفية القاتلة LC 50. لقد ادى ذلك الى الافتراض بان عدد من السلالات القياسية مختارة للاستخدام فى كل تجارب الفاعلية على Bt. السلالة القياسية الاولى التى تمت الموافقة عليها بين الدول والمؤسسات الصناعية المختلفة والمعامل الحكومية والاكاديمية هى سلالة Bt.thuringiensis (E61) التى جهزت فى فرنسا (المنتجات الصناعية المبكرة كانت تحصى هذا تحت نوع (الصنف) مع كفاءة مقدرة ١٠٠٠ وحدة دولية سامة (ITU) او وحدات دولية (IU) ملجم (فاجو وبرجز ١٩٦٤، برجز ١٩٦٧ - ١، برجز وآخرون ١٩٦٧، دلماج وآخرون ١٩٨١). لقد اقترح دلماج (١٩٧٥) سلالة قياسية اخرى HD-1-S-1971 مبنية على Bt kurstaki عندما تقوم تحت النوع هذا الاكثر فاعلية محل الباسيلليس ثورينجيسيز فى معظم المنتجات. "1-ID" تشير الى العزلات من وزارة الزراعة الامريكية USDA للباحث Howard Dulmage ومجموعة Bt الخاصة بهما والتى يحتفظ بها فى مجموعة ARS / USDA فى بيوريا بولاية النيو (دلماج وآخرون - ١٩٨٨). لقد قدرت كفاءة HD-1-S-1971 بمقدار ١٨٠٠٠ وحدة دولية/مللجم على اساس التحليل الحيوى ضد E-61. لقد كانت هذه مقارنة بين تحت نوعين مع مدى عوائل مختلف وتعطى دليل على الكفاءة النسبية فقط على الحشرة المعنية. لقد اصبح الحصول والستزود بسلالة HD-1-S-1971 متاحا بعد ذلك وبعدها ثم عمل HD-1-S-19 كسلالة قياسية اولية بقوة فاعلية ونشاط ١٦٠٠٠ وحدة دولية/مللجم (Beegle وآخرون - ١٩٨٦). لقد استخدمت ثلاثة سلالات قياسية من Bt اسراييلينسيز ، IPS-78 ، HD-968-1983 ، IPS-82. لقد قدرت كفاءة HD-968-1983 بمقدار ٤٧٤٠ وحدة دولية/مللجم ضد يرقات بعوض ايدس ايجيتى (دلماج وآخرون - ١٩٨٥).

قياس الصحة:

لقد تم تحديد الكفاءة باستخدام بيانات العلاقة بين التركيز والموت وتحويلها الى لوغاريتم - الاحتمال ومقارنة التركيز النصفى القاتل LC50 لمادة الاختبار مع المادة القياسية. كما اشير بواسطة Skovmand وآخرون (١٩٩٧) ان العقلانية

تعنى امكانية حساب الاختلافات اليومية فى داخل المعمل وفيما بين المعامل بفرض استخدام القيم النسبية بالاضافة الى السلالات القياسية ثم اقتراح بروتوكولات قياسية (Mc-Langhlin وآخرون - ١٩٨٤) ولكن الاختلافات مازالت موجودة بين المعامل.

كفاءة المستحضر عادة تحدد بقياس المادة فى مقابل المستحضر القياسى ويعبر عنها فى مسميات ITU/mg. يتم حساب الكفاءة من:

$$\text{Lc50 للمادة القياسية} \times \text{كفاءة المادة القياسية} = \text{كفاءة العينة IUT} / \text{ملجم Lc50 للعينة}$$

لقد برزت صعوبات مقارنة السمية من خلال الدراسة التى اجراها سكوفماند وآخرون (١٩٩٧) الذى قام بمقارنة ١١ منتج او مستحضر فى *Bt.israelensis* من خلال ما يزيد عن ١٥٠٠ تحليل حيوى لتقييم ما اذا كان انحدار خطوط الاحتمال متوازية وهى الظروف الضرورية لمقارنة النتائج. لقد وجد الباحثين بوجهة عام ان حجم الجسم ونوع المستحضر يؤثر على انحدار خطوط الانحدار والتى قد تؤدي الى مقارنات غير صحيحة مع المركب القياسى. لقد قام روبرستون وآخرون (١٩٩٥) بمقارنة نتائج التحليل الحيوى لبكتريا *Bt.tenebrionis* ضد *L-decemrlinata* وباسيليس كورستاكى ضد بلوتيللا زيلوستيللا ووجدوا ان التركيزات النصفية القاتلة تختلف فيما بين السلالات التابعة لنفس النوع. لقد اشار الباحثون ان الاختلافات الطبيعية قد ترجع الى الاختلافات الاكثر التى وجدت عند مقارنة LC/LD بين السلالات والاهداف مما يؤدي الى استنتاجات خاطئة كأن يقال بتطور المقارنة فى مجموع أفة ما بينما هى لا توجد فى الحقيقة.

يمكن قياس تأثير التغير فى *Bt* بعدد من الطرق مثل التركيز/الجرعة المطلوبة للقتل (LC/LD50) والوقت اللازم لاحداث القتل (LT50). التركيزات النصفية القاتلة LC50 بالرغم من انها مقياس شائع الا انه فى الغالب يصعب المقارنة بين الدراسات بسبب اختلاف طرق التحليل الحيوى. من الصعوبة مقارنة سمية سلالات *Bt* دون اعتبار الاختلاف الطبيعى فى حساسية مجموعة الحشرات والاختلافات بين عزلات البكتريا والتداخلات بين هذه العوامل (kinsiger وآخرون - ١٩٨٠). قياس وتقييم السمية يمكن ان يتعدى بواسطة كيفية الفعل. تقديرات الكمية

الفعلية للدلتا-اندوتوكسينات لكل جرعة او تناول تستخدم احيانا عنه مع الجرعة المقدمة للحشرة. لقد اقترح بعض الباحثين مقاييس دولية لل LD50/LC والتي قد تكون اكثر ملائمة لبعض انواع حشرات حرشفية الاجنحة والتي تستغرق ايام عديدة حتى تموت وحيث قد يتسبب الموت من عدوى ثانوية وليس عن الفعل السريع لتوكسين الباسيلليس Bt. لقد اقترح مقارنة الفشل في انتاج Frass (FFD50) والفشل في الوصول للتعذر (PFD50) باستخدام الوزن المكتسب كمقياس للتأثير مع تعذر الحشرات غير المعاملة. على نفس المنوال اقترح ليون وايبارا (١٩٥٥) استخدام ED50 باستخدام زيادة الوزن كمقياس للتأثير. لقد وجد الباحثان ان تركيز Bt ومكسب الوزن يرتبطا عكسيا على الاقل مع الحشرة التي قاما باختبارها لبيبتينوتارسا نكسانا.

بالرغم من ان هذه طرق ذات قيمة للاستخدام على حشرات خاصة ومستوى بحوث معينة فان LD50 هي اكثر الطرق شيوعا في قياس كفاءة المنتجات الصناعية LD50 تمثل مقياس كمي ومن ثم فانه اذا كان المركب (أ) له كفاءة موت تعادل ضعف وحدات المركب (ب) فانه في التطبيق الحقلى يجب ان تعطى نصف كمية (أ) نفس نتيجة المركب (B) كاملة. المقاييس الاخرى للكفاءة نوعية والعديد يكشف عن الاختلافات في التحليل مع حدود ثقة افضل. ولكن ليس بهذه النسبة المباشرة.

حساسية الحشرات للباسيلليس:

• لقد حاول مؤلفى هذا الموضوع تجميع قائمة الكائنات التي تستخدم في مكافحتها بكتريا Bt واختبرت بشكل مباشر او غير مباشر والموجودة في المراجع. مازالت هذه القوائم غير كاملة ولو انه في بعض الحالات لم يكن ممكنا سوى الحصول على ملخصات وكانت معظم الدراسات غير منشورة اى مجرد تقارير او سجلات شركات او مجلات محدودة التوزيع. من اهم الاصدارات قائمة الحشرات الحساسة لل Bt حتى عام ١٩٨٠ (كريبج لايجنيسبرش - ١٩٨١)، والانواع الحساسة للباسيلليس تينبيرينوس (كيلر و لايجنيسبرش - ١٩٩٣) بينما نشر كالاهايم (١٩٩٨) عن باسيلليس اسرئيلينسيس. مازالت هناك قليل جدا من المعلومات عن الاصناف السيروولوجية. في الحقيقة ان الاصناف السيروولوجية التي وضعت حديثا لم يعرف منها وجود كائنات حساسة لهذه العزلات الحديثة التي عزلت من البيئة. لقد وضعت

قاعدة معلومات تضمنت مقارنة كفاءة توكسينات Bt ضد الحشرات المختلفة مع وصف لطرق التحليل الحيوى والمراجع بواسطة فرانكين هويزن وينستروم (١٩٩٨). ان وضع قائمة للكائنات الحساسة لبكتريا Bt من الامور الصعبة وهى تحدث تشوية عن وضع التوكسينات المتعددة (بما فيها التوكسينات الخارجية) والتي قد تنتج بواسطة السلالات داخل مجموعة معينة (صنف سيرولوجى، صنف، تحت نوع ... الخ) وعدد المركبات التي تبني على بكتريا Bt ومدى تنوع طرق التحليل الحيوى وطرق التطبيق الحقلى والجرعات المستخدمة. من اهداف هذا الاستعراض المرجعى فحص التأثيرات على الكائنات غير المستهدفة وقد كان معدى القائمة حريصين ومتحفظين حيث شملت القائمة كل الانواع (صنف سيرولوجى/صنف ما أمكن) والتي سجل لها حساسية للبكتريا Bt فى هذه الجداول وصفت الحشرات بالحساسية اذا كانت نسبة الموت بعد المعاملة العملية بالبكتريا اكبر كثيرا مما فى المقارنة او تبعا لراى الباحث من ان البكتريا Bt كانت اكثر سمية بعد المعاملة الحقلية.

• يوجد بيانات متاحة عن القليل من الطرز السيرولوجية خاصة باسيلليس كورستاكى، ايزاواى ، ثورينجيسيز ، جاليريا ، اليسى ، اسرائيليسيز وزيندروليمس/سوتو، تينبيرونس. لقد سجلت Bt كورستاكى فاعلية ضد حشرات ٣١٨ جنس بينما وتحدث ١٦٦ جنس غير حساسة سواء فى المعمل او تحت ظروف الحقل (جدول ٢-١). بعض الاجناس التى تحتوى انواع حساسة وغير حساسة وضعت فى كلا المجموعتان. بالرغم من ان الباسيلليس كورستاكى عرفت على انها فعالة ضد حشرات حرشفية الاجنحة الا انها اظهرت وسجلت تأثيرات سامة بعدد من حشرات غمدية وغشائية الاجنحة ورتب اخرى. من المثير للدهشة انه لم يسجل طراز سيرولوجى فعالية مفيدة ضد رتبة واحدة من الحشرات.

• الدراسات المنشورة يشيع وضع قوائم اكثر عملية مبنية على الاصناف السيرولوجية/تحت الانواع مع الفعل الابادى ضد الحشرات مرتبة تبعا للرتبة. مقارنات قوائم الكائنات الحساسة وغير الحساسة اظهرت ان عدد من الانواع يقع فى كلا الكائنات بالرغم من انها تتبع نفس الصنف السيرولوجى. لقد وضعت تفسيرات عديدة لهذا الخلط حيث يرجعون الفرق بين الحساسة وغير الحساسة الى الاختلافات بين السلالات كما ان التعبيرات التوكسينية تختلف داخل الصنف السيرولوجى الواحد. بالاضافة الى ذلك فان بعض الدراسات استخدمت جرعات مختلفة من

الباسيلليس سواء على صورة جراثيم او توكسينات بلورية او مخاليط من المستحضرات النهائية بالطبع فانه مع التقويم المعملى ينقص الموت مع نقص الجرعة ولذلك فانه مع اختبارات الجرعة الواحدة فان الحساسية تعتمد على الجرعة المنتخبة الحشرة قد تظهر عدم حساسية فى جرعة الحقل بينما تكون حساسة مع الجرعات التى اختبرت فى المعمل. لقد اسفرت بعض الملاحظات عن عكس الاتجاه. من الممكن حدوث تعريف خاطئ للسلاسل وفى بعض الحالات يطلق اكثر من اسم على نفس تحت النوع من Bt (Bt terebrionis).

• يوجد عدد من التباينات التى مازالت فى حاجة للفهم عند تقييم كلا السمية والتاثيرات غير المستهدفة للمنتجات التى تعتمد على Bt. يوجد دليل ذو اعتبار مفاده ان الدلتا اندوتوكسينات التى تنتج بواسطة السلالات المختلفة من Bt تختلف فى مدى النشاط الابدائى على الحشرات وهذا قد يرجع للتعبير المختلف عن التوكسينات الفردية بين السلالات. بالاضافة الى ذلك فانه حتى المستحضرات المعتمدة على نفس عزلة Bt قد تختلف فى سميتها على نفس الحشرة. التعبير الخاص بالببتا ايسوتوكسين يعتبر من العوامل المسئولة عن الاختلاف. بالتأكيد فان المدى العريض من النشاط الذى يتسبب عن الباسيلليس ثورينجسينر يمكن ان يرجع جزئيا الى التعبير الخاص بالببتا-ايسوتوكسين ولكن لاى درجة تقوم سلالات خاصة بانتاج كلا التوكسين هذا مع توكسينات اخرى اقل تعريفا وهذا غير واضح. بعض من هذه النواحي سوف يفحص ويتناول بالتفصيل فى مواضع اخرى من هذا الكتاب.

جدول (٢-١): عدد أجناس الحشرات (الأنواع) الحساسة للأصناف السيروولوجية للباسيليس ثورينجينسز (الأرقام خارج المربعات) التي سجلت غير

حساسة (الأرقام داخل المربعات)

| Serovar | Serotype subspecies | Coleoptera | Diptera | Lepidoptera | Hymenoptera | Hemiptera | Isoptera | Orthoptera | Siphonaptera | Thysanoptera | Neuroptera | Plecoptera | Phthiraptera & Ephemeroptera | Trichoptera | Dictyoptera | Total no. genera |
|---------|------------------------|------------------|------------------|--------------------|------------------|------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|------------|------------|---------------------------------|-------------|-------------|----------------------------|
| 1 | thuringiensis | 20(25) 26(27) | 20(21) 10(17) | 190(266) 20(22) | 14(14) 22(30) | 9(11) 8(9) | 2(2) 2(4) | 1 7(8) | 2(2) | 1 | 1(2) | 5(9) | 5(9) | 1 | 2 | 266(362) 98(121) |
| 2 | finlimus | 1 | 1 | 6(6) | 10(10) | 1 | 2(2) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 12(12) |
| 3a3b | afroasi | 3(3) 2(2) | 3(3) 2(2) | 57(75) 4(10) | 3(4) 6(6) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 8(11) 66(84) |
| 3c3d | afroasi | 1 | 1 | 2(2) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2(2) 2(2) |
| 3a3b3c | turatoi | 14(15) 28(31) | 10(33) 24(28) | 234(330) 41(53) | 22(25) 37(65) | 17(18) 12(17) | 2(2) 2(2) | 1 1 | 1 | 1 | 1(4) | 2(2) | 2(6) | 1 | 1 | 318(437) 166(224) |
| 3a3b3c | subulphensis | 1 | 5(7) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 6(8) |
| 4a4b | dendrolimus | 4(4) 6(7) | 6(9) 4(7) | 57(77) 9(9) | 6(6) 5(8) | 2(2) 2(3) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2(2) | 2(2) | 1 | 1 | 10(12) 79(102) |
| 4a4b | solta | 1 | 1 | 45(56) 6(6) | 3(3) 3(6) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 28(36) 49(61) |
| 4a4b | kensae | 1 | 3(6) | 21(27) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2(2) | 1 | 1 | 1 | 14(21) 25(34) |
| 5a5b | gulleriae | 4(4) 7(10) | 12(20) 9(14) | 119(175) 10(13) | 6(6) 19(31) | 5(5) 4(5) | 1 1 | 1 1 | 3(5) | 1 | 2(4) | 3(3) | 3(3) | 1 | 1 | 8(12) 156(224) |
| 5a5c | canadensis | 3(4) 3(6) | 3(4) 3(6) | 3(3) 3(3) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1(1) 6(9) |
| 6 | entomocidus | 2(3) 1(1) | 4(8) 4(7) | 47(56) 3(3) | 3(3) 2(2) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 58(72) 10(13) |
| 6 | subtoxius | 1 | 1 | 12(14) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 14(15) |
| 7 | arizawai | 2(5) 3(8) | 2(5) 3(8) | 41(60) 6(6) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2(2) | 2(2) | 1 | 1 | 45(68) 13(16) |
| 8a8b | tenebrionis | 42(50) 20(21) | 1 4(4) | 4(5) 4(10) | 2(5) 1(12) | 3(5) 1 | 2(2) 1 | 2(2) 3(4) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 54(67) 4(4) |
| 8a8b | maritimus | 1 | 7(13) 4(9) | 11(12) 12(14) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2(2) | 2(2) | 1 | 1 | 22(29) 19(26) |
| 8a8c | ostriniae | 3(3) | 3(3) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2(2) |
| 8a8d | nigeriensis | 1 | 2(2) | 2(2) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 4(4) |
| 9 | tulwarthi | 2(2) | 5(7) | 16(18) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2(2) | 2(2) | 1 | 1 | 22(29) |
| 10a | cucasicus | 1 | 4(7) | 4(4) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 9(12) |
| 10a10b | darmstadtensis | 2(2) 2(2) | 9(14) 5(8) | 10(11) 7(7) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 10(11) 22(28) 14(17) |

تابع جدول (١-٢):

| Serovar ¹ | Serotype/ subspecies | Coleoptera | Diptera | Lepidoptera | Hymenoptera | Hemiptera | Isoptera | Orthoptera | Siphonaptera | Thysanoptera | Neuroptera | Plecoptera | Phthiraptera & Ephemeroptera | Trichoptera | Dictyoptera | Total no. genera |
|----------------------|-------------------------|------------|---------|-------------|-------------|-----------|----------|------------|--------------|--------------|------------|------------|---------------------------------|-------------|-------------|------------------|
| 36 | malayensis | 1 | 3(5) | | | | | | | | | | | | | 3(5) |
| 37 | andalusiensis | 1 | 1 | 3(3) | | | | | | | | | | | | 0 |
| 38 | oswaldocruzi | 1 | 3(3) | 1 | | | | | | | | | 1 | | | 5(5) |
| 39 | brasilienis | 1 | 2(2) | 1 | | | | | | | | | | | | 2(2) |
| 40 | huazhongensis | 1 | 2(2) | 1 | | | | | | | | | | | | 3(3) |
| 41 | guiyangensis | 1 | 2(2) | 3(4) | | | | | | | | | | | | 2(2) |
| 42 | higo | 1 | 3(4) | 3(3) | | | | | | | | | | | | 5(6) |
| 43 | wratistoviensis | 1 | 2(2) | 2(2) | | | | | | | | | | | | 1 |
| 44 | wenguanensis | 1 | 2(2) | 2(2) | | | | | | | | | | | | 5(5) |
| 45 | amagiensis | 1 | 2(3) | 1 | | | | | | | | | | | | 3(3) |
| 46 | tiannanensis | 1 | 2(2) | 2(2) | | | | | | | | | | | | 4(5) |
| 47 | sinichensis | 1 | 3(3) | 3(3) | | | | | | | | | | | | 4(5) |
| 48 | wuhanensis | 1 | 1 | 3(3) | | | | | | | | | | | | 0 |
| 49 | oyamensis | 1 | 2(2) | 1 | | | | | | | | | | | | 0 |
| 50 | | 1 | 4(5) | 4(4) | 1 | | | | | | | | | | | 5(5) |
| 51 | | | | | | | | | | | | | | | | 10(11) |

¹ serovars as listed in Lecadet et al. 1999
² morrisoni and tenebrionis are both H8a8b serotype
³ subtoxicus and entomocidus both serotype 6
⁴ caucasicus is H10a (see Chapter 2)

تابع جدول (۱-۲):

[illegible]

الاختلافات في الحساسية للباسبيليس Bt بين الاجناس:

بالرغم من اننا تناولنا بالتلخيص حساسية الحشرات لل Bt كما هو مذكور في جدول (١-٢) فانه قد تم استنتاج ان سلالة Bt فردية او منتج فردى ليس بالضرورة ان يكون سام لكل الانواع داخل الجنس - مثال ذلك ما وجده Peacock وآخرون (١٩٩٨) ان ٤٢ نوع (فى سبعة عائلات) من حشرات حرشفية الاجنحة المختبرة للحساسية الى Foray 48 B (تكافئ ٨٩ BIU/هكتار) كان منها ٢٧ نوع حدث فيها موت. لقد شملت هذه الانواع كل بابليونيدى، ٣ نيمفاليدي، كل ٣ ساتيرنيدي، ٧/٥ جيومستيريدي، ٢٦/١٤ من نوكتويدي. اليمانتريدي الوحيدة التى اختبرت كانت غير حساسة. لقد وجد الباحث. لقد استخلافاً بين الجنس فى الليثوفين والكاتوكالا مع ٨/٦ نوع من الكاتونمالا اظهرت حساسية لمستحضر الفوراي. لقد خلص الباحثون الى ان الحساسية للباسبيليس فى حاجة للتقييم حالة بحالتها. على نفس المنوال كانت حشرة دودة ورق القطن الصغرى حساسة للباسبيليس كورستاكي، ايزاوايا، كينيا ولم تكن حساسة للباسبيليس تولورتى او الثورينجينسيز (Amonkar وآخرون ١٩٨٥) بينما كانت حشرة S.frugiperda اكثر حساسية للسلالات Bt كينيا، تولورتى يليها الاصناف السيروولوجية Bt كينيا وايزاوايا وكورستاكي. بالنسبة لدراسة اخرى وجد سلامة (١٩٩١) ان معظم المزارع الاكثر فاعلية ضد دورة ورق القطن كانت HD-593 (ايزاوايا)، HD-110 (انتوموسيدي)، HD-263 (Bt كورستاتى)، HD-554 (كانادينسير) مع LD50 بلغت ٢٢، ١٧، ٣٦، ٣٨ ميكروجرام اندوتوكسين لكل مليليتر على التوالى مع المقارنة ٢١٦٠ ميكروجرام/مليليتر HD-١-١٩، وهو المستحضر القياسى. لقد قام كالفون وبارجاك (١٩٨٥) باختبار عدد من الاصناف السيروولوجية والسلالات ضد العمر الاول من دورة ورق القطن ووجد ان السمية المرتفعة كانت مع السلالات التى تنتمى الى باسيليس ايزاوايا وكينيا وانتوموسيدي. على العكس اشارت العديد من التقارير ان انواع Spodoptera لم تكن حساسة لمدى واسع من الاصناف السيروولوجية. خلصت هذه التقارير ان سمية Bt على انواع خاصة من الحشرات لا يمكن التنبؤ بها بشكل دقيق من جراء فحص السمية على الانواع المرتبطة.

الاختلافات فيما بين الصنف السيروولوجى:

فى الغالب يكون نوع واحد من الحشرات اكثر حساسية لاكثر من توكسين او صنف سيروولوجى او تحت انواع. فى العديد من الحالات يوجد العديد من تحت الانواع نشطة ضد رتبة واحدة خاصة حرشفية الاجنحة حيث ان باسيليس

Bt aizawai, alesti, anduze, berliner, canadensis, caucasicus, cereus, colmeri, darmstadiensis, entomocidus/subtoxicus, finitimus, fukuokaensis, galleriae, gelechia, kenya, kurstaki, kyushuensis, japonensis, morrisoni/tenebrionis, ostrinae, pondicheriensis, shandongiensis, sotto/dendrolimus, subtoxicus, sumiyoshiensis, thompsoni, thuringiensis, tianmensis, tohokuensis, tolworthi, toumanoff, wuhanensis and yunnanensis.

اظهرت سمية للأنواع المختلفة. في العديد من الدراسات الاخرى اظهرت عزلات مختلفة الاصناف السيروولوجية سمية مختلفة لنفس الحشرة. مثال ذلك يرقات اكياجانانا التي امكن مكافحتها بشكل فعال بواسطة Bt كورستاكي (اكثر سمية على اليرقات) يليها Bt جاليريا و Bt ثورينجينسيز. في المقابل كانت Bt سوتو، انتوموسيدس، ايزاوايا او الاندوتوكسينات الخاصة بها لوحدها ليست سامة على اليرقات. لقد كانت Bt كورستاكي اكثر تحت الأنواع شيوعا التي استخدمت ضد الفراشة الفجرية ليمانتياريا ديسبار ولكن فيما بين الاصناف السيروولوجية الاخرى السامة ضد هذا النوع كانت Bt جاليريا، Bt سبتوكيس، Bt انتيموسيدس اكثر فعالة في احداث الموت بينما اظهرت الـ Bt ثورينجينسيز والليست وسوتو وندروليمس معدلات موت اقل (Ridet - 1973). لقد بلغت قيم التركيز النصفى القاتل LC50 للجسام الجرثومية المنقاة للباسبيلس سومي يوشينسيز، ذاكوكنسيز، دارمستينسيز والجايونسينسيز على يرقات دودة الحرير تساوى 7.35، 6.45، 3.08، 2.63 ميكروجرام لكل جرام غذاء على التوالي مما يوضح ان مستويات السمية تساوى 5-10 مرة اقل من السلالة القياسية HD-1 (Bt كورستاكي) (0.49 ميكروجرام رجم غذاء) (واسانو واخرون - 1988). عندما استخدمت Bt ضد هليكوثريا اريجييرا و H.punctigera في استراليا Bt كورستاكي HD-1 وسلالة Bt كينينا كانت اكثر سمية (LC50 40 - 70 ميكروجرام/مليلتر) وكانت سلالات ايزاوايا، كورستاكي HD-336 و جاليريا ويوهانسيز ذات سمية متوسطة اما Bt ثورينجينسيز كانت اقل سمية (LC50 2100 - 11000 ميكروجرام/مليلتر) و Bt كاتادينسيز غير سامة (LC50 22000 - 44000 ميكروجرام/مليلتر) و (Teakle واخرون - 1992).

من بين 12 طراز سيروولوجي اختبرت ضد فراشة الشمع "جاليريا ملليونيللا" لم يكن هناك ما هو اكثر من Bt جاليريا (طراز وراثي 5a5b). الطرز السيروولوجية 3a3b

(Bt كورسناكى)، 3a (اليسنى)، 4a4b (سوتو)، 4a4c (كينيا) كلها تحتوى على بعض السلالات التى كانت متوسطة الفاعلية ضد فراشة الشمع ولكن 5a5b فقط (Bt جاليريا) و ٧ (Bt ايزاويا) تحتوى على سلالات عالية الفاعلية (Jarredt and Bvrge - ١٩٨٢). بالرغم من ان Bt israelensis هى الشائعة الاستخدام ضد البعوض الا انها ليست تحت النوع الوحيد ذات النشاط كتوكسينات ضد البعوض. بعض سلالات Bt كورسناكى تنتج توكسينات تبيد البعوض ولو انها اقل فاعلية عن Bt اسرانيلىنسىز. لقد كانت LC50 ضد السلالات الاسرائيلية وكورسناكى ضد بعوض A.aegypti تساوى ٠,٠٥٤ ، ٢١٠ مللجم/مليلتر على التوالي. وهكذا من الامثلة التى لن اقوم بسردها فى هذا المقام.

الاختلافات داخل الصنف السيروولوجى: Within Serovar Variation

العلاقة بين الصنف/تحت النوع لا تستخدم للتنبؤ بكفاءة السلالة (بارك وآخرون - ١٩٩٨) حيث ان العزلات تظهر اختلاف معتبر داخل الطراز السيروولوجى/تحت النوع الفردى. من اكثر الدراسات عنسمية العزلات داخل الاصناف السيروولوجية على انواع من الحشرات تلك التى اجراها دلماج ومعاونوه والتى نشرت بواسطة دلماج وآخرون (١٩٨١). لم تنشر الدراسات كاملة ولكن ملخصات فقط. لقد اظهرت الدراسة ان عمل مجاميع بناء على الطراز السيروولوجى يقسم جزئيا مدىسمية العزلات ولكن يظل هناك تباين كبير فى النشاط وفى الغالب يتراوح من صفر وحتى نشاط عالى فى كل طراز سيروولوجى ضد حشرة ما. لقد وجد دلماج ان كل طراز سيروولوجى يمكن تقسيم تحت مجاميع باستخدام معدل او نسبة النشاط (بقسمة السمية على حشرة/السمية لحشرة اخرى) فى مجاميع متجانسة احصائيا مما يحقق تقسيم جزئى داخل الطراز السيروولوجى.

اوضحت العديد من الدراسات الاخرى اختلافات وتباينات متشابهة فى السمية داخل الاصناف السيروولوجية. مثال ذلك عزلات داخل بعض الاصناف السيروولوجية اوضحت قليل او عدم فاعلية (دراوند وآخرون ١٩٩٢). لقد احدثت عزلات مختلفة من باسيليس كورسناكى نسبة موت مرتفعة (اكثر من ٧٥%) ومتوسطة (٢٥-٧٥%) ومنخفضة حتى الصفر على هذه الحشرة. لقد قام ساينو وآخرون ١٩٩٦ بفحص ١٤٤٩ سلالة تمثل ٣١ صنف سيروولوجى للكشف عن فاعليتها ضد بعوض كيوليكس بينسىز وفراشة حشرة تى البينيكيتاتس مع عزلات لا تحتوى على صنف سيروولوجى وجدت العزلات ١٢٩٧/١٥٢ سامة على الحشرة الاولى مقابل ١٤١٩/٣٠ للحشرة الثانية وكانت كلها سامة على الحشرتان. هناك مثال اخر يوضح ان الصنف السيروولوجى لا يعكس السمية كما فى

العزلة NTB-88 وهي عذلة من التربة فى كورفا تنتمى H8a8b (Bt موريسونى) ولكنها كانت غير سامة لمدى من حرشفة الاجنحة والغمدية وثنائية الاجنحة بما فيها نوعى البيوجين (Dark واخرون - ١٩٩٨).

سمية دلتا-اندوتوكسين:

تعتمد تخصصية تحت انواع Bt على التوكسينات الناتجة ولو ان فصل نشاط كل توكسين عن المتباينات فى نظم التحليل الحيوى والحشرات ونوع المستحضر او منتج Bt من الصعوبة بمكان. تختلف مدى التوكسينات الناتجة بواسطة العزلات Bt بشكل كبير وحتى مع الدلتا-اندوتوكسينات والتي تعتمد عليها معظم منتجات Bt الجارية حاليا. سمية Bt tenebrionis كمثال يتبنى على التوكسين الفردى Cry 3A بينما Bt israelensis حتى 5 cry و cyt توكسينات توجد فى سلالة واحدة. الباسيلليس كورسناكى من سلالة HD-1 تحتوى جينات لعدة بروتينات بلورية: Cry 1 Aa ، Cry 1 Ab ، Cry 1 Ac ، Cry 2A ، Cry 2B (Moar واخرون ١٩٩٥ - ١ ، Lee واخرون - ١٩٩٦). بالرغم من التشابه العالى فى الحمض الامينى الذى غالبا ما يوجد بين بعض من هذه التوكسينات فانها غالبا ما تحدث تأثيرات ابادية مختلفة. حيث ان العديد من التقارير تشير الى استخدام عذلة Bt او السلالة او تحت النوع فان التأثيرات الفعلية لكل توكسين فردى غالبا غير معروفة ولو ان زيادة الاهتمام عن النباتات المهندسة وراثيا التى تعبر عن توكسينات Bt الابادية على الحشرات ادت الى العديد من الدراسات الحديثة التى تركز على تأثير التوكسينات الفردية. لقد قام فرانكين هويزن واخرون (١٩٩١) باختبار البروتينات التوكسينية Cry 1 AC ، Cry 1Ab ، Cry 1 Aa فرديا ضد يرقات التابعة لعائلة تورتريسيد والليماتريدس واللاسايوكامبيد والنيتلتويد. اختلفت التأثيرات بين الحشرات المختلفة.

جدول (٢-٢): امثلة عن مدى نشاط توكسينات Cry 1 ضد حشرات حرشفية الاجنحة

+نشاط +نشاط قليل - عدم نشاط * لم تختبر

| Species | Cry gene | | | | | | | |
|--------------------------------------|----------|-----|-----|----|----|----|----|----|
| | IAa | IAb | IAC | IB | IC | ID | IE | IF |
| Spodoptera exigua | + | + | . | . | + | + | + | + |
| S. littoralis | . | . | . | . | + | . | + | * |
| S. exempta' | + | + | . | + | + | + | + | * |
| Actebia fennica | . | . | . | . | . | . | . | * |
| Trichoplusia ni | + | + | + | * | + | + | + | + |
| Heliothis virescens | + | + | + | . | + | . | + | + |
| Ostrinia nubilalis | + | + | + | * | * | * | + | + |
| Mamestra brassicae | + | + | . | . | + | . | . | * |
| Pieris brassicae | + | + | + | + | + | . | . | * |
| Manducta Sexta | + | + | + | . | + | + | + | * |
| Choristoneura fumiferana | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Lymantria dispar | + | + | + | . | + | + | . | + |
| Orgyia leucostigma | + | + | + | . | + | + | . | + |
| Malacosoma disstria | + | + | + | + | + | + | + | * |
| Bombyx mori | + | + | . | . | + | + | + | * |
| Plutella xylostella | + | + | + | + | + | . | . | * |
| Lambina fiscellaria | + | + | + | . | + | + | + | * |
| Perlieuoptera coffeella ² | - | - | + | + | - | * | - | * |

التنشيط بين الدلتا-اندوتوكسينات Synergy between Delta-endotoxins

قد استهدفت العديد من الدراسات التداخلات بين توكسينات Cry 1 من سلالة HD-1 لقد اشار الباحث فان فرانكين هويزن واخرون (١٩٦١) ان توكسينات Cry 1 لها تأثير منشط قليل ضد حشرات ليمانتريدس خاصة ليمانتريا ديبار (تستخدم ٢٨ ضعف منفردا عما لو استخدم مخلوطا). في عام ١٩٩٢ قام تباشنيك باعادة تقييم البيانات واستنتج ان الدراسة السابقة لم تأخذ في الاعتبار التأثير الكافي بما يوضح التنشيط على الحشرتان كما لم يظهر تنشيط بين توكسينات Cry 1 A ضد الانواع السبعة من الحشرات. لقد قام Lee واخرون (١٩٩٦) بفحص التنشيط بين توكسينات Cry 1 A ضد الفراشة الغجرية وديدان الحرير وقد لوحظ حدوث تنشيط بين Cry 1Aa و Cry 1Ac مع الفراشة الغجرية (حوالي ٤-٧ اضعاف القيمة التي تنبأ بها من تأثيرات التوكسين المنفرد) وكانت العلاقة بين Cry 1Aa و Cry 1Ab تضادية. اوضحت الدراسات المعملية انه عند تخطيط الدلتا-اندوتوكسينات

Cry 1 F و Cry 1Ac من بكتريا Bt زادت السمية على يرقات دودة اللوز الامريكية بمقدار ٢٦ مرة كما اتضح من قيم التركيزات الفعالة (EC50) (Chakrabarti) وآخرون (١٩٩٨ -). لقد وجد نفس الباحث عام ١٩٩٢ تنشيط بين توكسين (Cyt1A) 27-Kda وتوكسينات (Cry 4) 150 06 65 - Kda من السلالة الاسرائيلية ضد يرقات بعوض الايبس اجيبى (حتى ١٠ امثال زيادة فى الكفاءة) واحتمالات تأثيرات تضادية ضعيفة بين بروتينات ٦٥ ، ٣٠ Kda. لقد تحصل العديد من البحوث على تأثيرات تنشيط من جراء خلط التوكسينات او البروتينات من Bt مع بعضها البعض. لقد خلص العديد من الدراسين ان استخدام مستحضرات متعددة قد تؤدي الى حدوث تأثيرات اضافية او تضادية وقد تكون التأثيرات غير ذات ارتباط مع سمية الاندوتوكسينات. لقد وجد امين وآخرون (١٩٩٨) ان تأثيرات خليط مستحضرات Bt aizawai (Xentari ASR) والكورسناكى (6AFR) Dipel كانت تضادية ضد نفس العائل. لقد كانت Xentari ذات تأثيرات تضادية معنوية على دودة اللوز الامريكية مع المستحضرات الثلاثة للديبل. لقد حاول Asaro and Hori (١٩٩٥) وآخرون (١٩٩٥) استخدام الراشح من المزارع البكتيرية لتنشيط الدلتا-اندوتوكسينات ضد دودة ورق القطن الصغرى. لم يتحصل على هذا التأثير ضد فراشة الحبوب. وجد ان Bt النشطة ضد دودة ورق القطن يمكن تنشيطها بالراشحات من مزارع سلالات غير فعالة ضد دودة ورق القطن مثل Bt japonensis مما ادى الى الاقتراح بان التأثير لا يرجع الى الدلتا اندوتوكسين الذاتى ولكن بسبب عوامل اخرى لم تعرف بعد.

سمية البيتا-اكسوتوكسينات:

يسبدو ان سمية بعض السلالات ضد الحشرات تنتج من البيتا-اكسوتوكسين (Maciejewska وآخرون ١٩٨٨). سمية التوكسين الخارجى ضد الذباب المنزلى والمرتبطة مع نقص نشاط الباسيليس اندوتوكسينات او مع تحجيم النشاط بعد التعقيم الاوتوكلا فى (الاكسوتوكسينات ثابتة حراريا بينما التوكسينات الداخلية تنهار بالحرارة) استخدمت لسنوات عديدة كاختبار للتفرقة بين السلالات عن حدوث الاكسوتوكسينات. البيتا-اكسوتوكسينات تنتج بواسطة عدد من تحت الانواع. لقد وضع الباحثان كريج ولانجينبروش (١٩٨١) قائمة تحتوى على ما يزيد عن ٧٠ نوع من الحشرات الحساسة للبيتا-اكسوتوكسينات. بالاضافة الى عدد من انواع الافات فان الاكسوتوكسين اوضح تأثير ضار على الحشرات النافعة مثل النحل (كريج ولانجينبروش ١٩٨١). كما سيرد لاحقا

اتضح ان الاكسوتوكسين يسبب خطورة على الثدييات حيث كانت الجرعة النصفية القاتلة LD50 بالحقن البريتوني على الفئران تساوي ١٠-٢٠ ميكروجرام/جم من وزن الجسم وحدثت سمية من بعض املاح البيتا-اكسوتوكسينات في الفراغ حتى مع الجرعات الوراثة (Sebesta واخرون ١٩٨١).

بسبب الاخطار المختلفة على الكائنات غير المستهدفة والثدييات برزت متطلبات في معظم الدول تشترط ان المركبات التي تعتمد على الباسيلليس يجب ان تكون خالية تماما من البيتا-اكسوتوكسينات. هذا بالرغم من ان في الاتحاد السوفيتي سابقا وغيره من دول الكتلة الشرقية انذاك كانت تستخدم تجهيزات Bt محتوية على التوكسينات الخارجية خاصة تلك التي تعتمد على Bt ثورينجنسيس وتم الاعلان عن بعض البيانات عن تاثير البيتا-اكسوتوكسينات ضد بعض الحشرات. لقد اظهرت البيتا-اكسوتوكسينات سمية واضحة على العديد من انواع الحشرات خاصة ذات الجناحين والاكاروسات والبراغيث. لقد وجد ان البيتا-اكسوتوكسين من باسيلليس ثورينجنسيس كانت سامة لنيماتودا يماثودا تعقد الجذور حيث انت الى قتل ٨٥-٩٥% من اليافاعات من العمر الثاني بعد سبعة ايام (Ray and Rana - ١٩٧٩). لقد وجد بعض الباحثين ان حوريات Geomris punctipes كانت حساسة للبيتا اكسوتوكسينات بينما الافات البالغة لنفس النوع لم تتأثر على الاطلاق. يمكن ان يكون للاكسوتوكسينات تاثير ممانع او ضار لتغذية بعض الحشرات (Thomsen واخرون ١٩٩٨).

التنشيط بين بيتا-اكسوتوكسين ودلتا-اندوتوكسين / الجراثيم

تناولت العديد من الدراسات تقسيم تاثير استخدام كلا الاكسوتوكسين والدلتا اندوتوكسين و/او الجراثيم من الباسيلليس. لقد اتضح ان استخدام المنتج التجاري المحتوي على الاكسوتوكسين "Thuringiensin ثورينجنسيس" مع خليط الجراثيم والبلورات للباسيلليس كورستاكي قد يسبب تاثير اضافي مقوى ضد اليرقات حديثة الفقس للودة ورق القطن الصغرى (Moar واخرون ١٩٨٦).

لقد وجد الباحثان ميلر وهاربر (١٩٨٧) حدوث تنشيط بين الاكسوتوكسينات والديبيل ضد اليرقات حديث الفقس (٣-٦ ساعات في العمر) الحشرة S.Frugiperda خاصة عند مستوى تركيزات LC30 لكليهما حيث حققا ١٠٠% موت بالمقارنة بالموت المتوقع ٥١%. بعد ذلك وجد جارونر (١٩٨٨) مع نفس الحشرة ان استخدام مخاليط من الاكسوتوكسينات (مستحضر ABG-6162 بمعدل ١٢٠-٣٦٠ ميكروجرام/مليلتر)

ومعدلات LC50 للباسيلليس كورستاكي (ديبيل) ذات تأثير تنشيطي وذلك بداية من ٣-٧ أيام وبعد ذلك كان ارتباط البيتا-اكسوتوكسينات بالموت مرتفعاً للغاية. لقد ظن الباحث Naron (١٩٩٣) ان هذه النتيجة تعكس الفعل البطيء للبيتا-اكسوتوكسين والذي عبر عنه بفشل الانسان. لقد اوضح Dubois (١٩٨٦) حدوث تنشيط بين باسيلليس كورستاكي HD-1 والاكسوتوكسين ضد العمر الثاني من الفراشة العجربة.

مقارنة كفاءة او فاعلية مستحضر الباسيلليس:

من الصعوبة البالغة مقارنة منتجات Bt للكشف عن الفاعلية ضد نفس الحشرة. المشكلة الاساسية تكمن في نقص القياسية في التعبير عن المواد الفعالة لكل مركب. معدلات الاستخدام تختلف ويتم التعبير عن المواد الفعالة على صورة جراثيم/مليلتر (هذا عديم المعنى في معظم الحالات) والوزن الجاف (غالبا يشمل مواد التخمر ومن ثم لا تقيس المادة الفعالة فقط) والوحدات الدولية (متاحة فقط لبعض تحت الانواع وتقاس ضد نوع واحد من الحشرات). بهذه المشكلة عن القياسية فان المقارنات التي سنتناولها في هذا المقام يجب ان تعتبر كنيل ارشادي عام. لقد فشلت العديد من الدراسات في ايجاد اختلافات بين مختلف المستحضرات في المعمل او الحقل. مثال ذلك ما وجدته باتي وكاريز (١٩٧٤) عندما استخدما الباكترين ، البيوتريول ، ديبيل ، ثوروسيد ضد دودة اللوز الامريكية من عدم وجود فروق معنوية في الفاعلية ضد اليرقات المحصورة في اقفاص مع نباتات القطن. في العديد من الحالات اظهرت الانواع المختلفة من مستحضرات Bt تأثيرات مختلفة على الانواع المستهدفة والبيئة. في بعض الحالات كان لنوع المستحضر (كريات - سائل) تأثير كبير على الفاعلية مثال ذلك ما قام به جرانت واخرون (١٩٨٥) من اختبار العديد من المستحضرات التجارية للباسيلليس اسرانيولينسيز في مكافحة البعوض في الحقل في ولاية كاليفورنيا. لقد اتضح ان محبيبات الرمل للفيكيتوباك الثقيلة مع محتوى قليل من المادة الفعالة كانت غير فعالة ضد الكيولييكس ترسالييس عندما استخدمت بمعدلات اقل من ٢٨ كجم/هكتار. المعلق المائي للفيكيتوباك والاعلى تركيزا اعطى ٩٨% موت عند معدل ٠,٥ كجم/هكتار. بعض الاختلافات في الفاعلية التي ترجع الى المستحضر قد تنتج من اختلاف سلوك التغذية للحشرات المعرضة. لقد تحصل على استجابات مختلفة متشابهة للمستحضرات المختلفة بواسطة مور وترمبل (١٩٩٠) اللذان قاما باختبار مستحضرات باسيلليس كورستاكي في مستحضرات مختلفة ضد الدودة القارضة وقد وجد ان مستحضرات المساحيق للبلل/محبيبات SAN415, WG354, ABG-6218 لها قيم

تركيزات نصفية قاتلة LC50 منخفضة (٧ ، ٣,٥ مرة) عن الديبيل (٢×) عندما استخدمت بنفس المعدل ميكروجرام/مليلتر غذاء. المستحضر السائل (SAN415) كان له قيم LC50 اقل من المساحيق القاتلة للبلل ولو ان معدلات التطبيق الحقل لم توضح. المستحضرات قد تختلف في الفاعلية بين انواع الحشرات. لقد وجد بيرجرجون ومارنوريت (١٩٧١) ان مستحضرين ذات نشاط متساو ضد افة دقيق الكرنب يمكن ان يختلفا بشكل عريض في الكفاءة ضد دودة الحرير حيث اظهرت احد المستحضرات ١٥ مرة اكثر فعالية عن الاخرى. الاختلافات في الحساسية قد ترتبط بطور الحشرة المختبرة. عادة اليرقات الصغيرة خاصة الاطوار الاولى تكون اكثر حساسية تحت نفس الظروف عن اليرقات الكبيرة. لقد وجد موريس (١٩٨٦) ان اليرقات الصغيرة لحشرة مامستراكونفجيوراتا كانت اكثر حساسية للديبيل ١٣٢ عن اليرقات العجوزة ولكن الاخيرة كانت اكثر حساسية للثوروسيد LV ٤٨ عن اليرقات الصغيرة. مع اليرقات هيفنتاريا كونا كانت قيمة LC50 بعد ٤٨ ساعة تساوي ٥٤١ ميكروجرام/مليلتر بينما كانت LC50 لمستحضر البيوبيت (Bt كورسناكي) تساوي ٤٤٤ ميكروجرام/مليلتر مع اليرقات المتقدمة في العمر كان الاختلاف بين الثوروسيد (٢١٣٣ ميكروجرام/مليلتر) والبيوبين (٤٠٠ ميكروجرام/مليلتر) واضحا.

قد تحتوى المنتجات على مخاليط من الطرز السيرولوجية للباسيليس او جينات التوكسين والتي توجد عادة في اثنين من الطرز والانواع السيرولوجية قد تندمج في عزلة فردية من خلال النقل الجيني بالاقتران والذي قد يؤثر على الخطر البيئي ونظامه. لقد اقترح من خلال عدد من الدراسات وجود مميزات من جراء استخدام الاندوتوكسينات من اكثر من طرز سيرولوجي او صنف Bt ضد بعض الافات. افات القطن من عائلة noctuid مثل ديدان اللوز ذات حساسية عالية للباسيليس جاليري ايزاوايا وكانت الاخيرة اكثر فعالية بمقدار عشرة اضعاف عن الكورسناكي ومائة ضعف عن بيرليز (ثورينجنيسيز) وكلاهما استخدم تجاريا ضد هذه الافات (Frutos وآخرون ١٩٨٧). بالرغم من ان الباسيليس كورسناكي في الغالب تعتبر الاساس والمقياس للمبيدات الحيوية التي تستخدم ضد الافات التابعة لحشرية الاجنحة الا انها ليست دائما الاكثر سمية على الفراشات. من بين سلالات تم تقييمها ضد يرقات فراشة الصنوبر والفراشة الراهبة والفراشة الشتوية كانت السلالات الاكثر سمية هي Bt سوتو ، ثورينجنيسيز وايزاوايا على الترتيب وليس الكورسناكي. من الشائع ان تجد عزلات ذات سمية عالية عن منتجات

الباسيليس التجارية المتاحة تجاريا خاصة عندما تختبر سلالات من بين عدد من تحت
الانواع (جاريث و بيرنز - ١٩٨٦).

تركيب التوكسينات والجراثيم ايضا ذات تأثير ملحوظ على كفاءة المنتجات ضد
يرقات بلوتيللا زيلوستيلا. لقد استخدم اسانو وسيكى (١٩٩٤) اربعة مستحضرات تجارية
متاحة على صورة مسحوق قابلة للبلل وهم باسيلكس (ازاوايا+كورستاكى) ، ثوريسيد
(ازاوايا عادة Bt كورستاكى) وتفارو-Bt ، الديبيل (كورستاكى) وثلاثة مساحيق قابلة
للبلل تحت الجريب وهم KM301 (توكسين بللورات Cry 1Ac والجراثيم المينة) ،
KM202 ، Cry 1Ac - KM302 فى خلايا بسيدوموناس المقتولة. لقد اتضح ان
المستحضرات المبنية على توكسينات متعددة وجراثيم مينة كانت اكثر كفاءة ضد يرقات
العمر الثالث عن التوكسين البلورى المفرد فى كبسولات وكان الثوروسيد هو اكثر
المستحضرات التجارية سمية. فى الغالب لا يوجد سبب واضح عن الاختلافات بين
التقارير المختلفة عن المركبات المدروسة. مثال ذلك انه مما يثير الدهشة مع مقارنة نتائج
الديبيل والثوروسيد (فى اوقات مختلفة وكلا المركبين يعتمدا على سلالة باسيليس
كورستاكى HD-1) فان التقارير اشارت الى اختلافات فى السمية على نفس الحشرة تحت
نفس الظروف (Mathur وآخرون ١٩٩٤). فى المعمل كان ABG6.05 (كورستاكى)
اكثر سمية من الديبيل WP (كورستاكى) والباكتوسبين (Bt ثورينجنسيز) ضد يرقات دودة
ورق القطن الاعمار من الاولى وحتى الخامسة ولكن الثوروسيد wp (كورستاكى ايضا) لم
يكن فعالا (Jansens وآخرون ١٩٨٤). لقد وجد تاكاكى (١٩٧٥) اختلافات فى الفاعلية
بين عدد من المنتجات Bt ضد الحشرات فى اليابان. مثال ذلك ان هذا الباحث سجل ان
مستحضرات Dipel (sic كورستاكى) و Selectozin (Bt ايزاوايا) كانت فعالة ضد
افات الحضر خاصة دودة ورق القطن الصغرى بينما كانت Bt سوتو والثوروسيد A غير
فعالة.

من اكثر منتجات الباسيليس شيوعا على امتداد السنوات الديبيل Dipel الذى تنتجة
معامل ابوت وشيكاغو. الديبيل يعتمد على سلالة Bt كورستاكى ، HD-1 وانه بينما
المستحضرات تغيرت خلال السنين الا انه استخدم فى العديد من الدول ضد عدد كبير جدا
من انواع الحشرات وقليل من الاكاروسات على المستوى التجريبي والتجارى فى
المكافحة. الرجوع الى قوائم الحشرات والكائنات الاخرى الحساسة او تلك التى تتحمل
مستحضرات الديبيل يوضح تخصص السلالة الضرورية من الباسيليس كورستاكى تحت

الظروف الحقلية. لقد كان الديبيل ساما فقط للقليل من انواع الاكاروسات وحشرات غمدية وثنائية ونصفية الاجنحة ولكنها سجلت سمية على ١٧٠ نوع من حشرات حرشفية الاجنحة. معظم الحشرات التى شملتها القائمة ولم تكن حساسة للديبيل هى المتطفلات والمفترسات مما يعكس اهتمام الباحثين بينما كانت هناك فاعلية شاملة للباسيلليس كورسناكى. بعض انواع حرشفية الاجنحة وضعت فى القائمة تحت الحساس وغير الحساس. هذا التضارب بين التقارير قد يرجع الى نتائج الدراسات الحقلية حيث سجلت الافات المستهدفة على انها غير حساسة حيث اظهر الديبيل فاعلية منخفضة كذلك فان الفاعلية الفقيرة قد ترجع الى بعض العوامل مثل نقص الثبات عنه مع العوامل المسؤولة عن الحساسية فى نوع الحشرات.

دور جراثيم الباسيلليس فى موت الحشرات والافات الاخرى:

لقد درست نسبة موت الحشرات التى ترجع الى جراثيم Bt بالمقارنة مع التوكسينات. لقد اظهرت بعض الدراسات (1982 B. Mohd. salleh and Lewis) انه بينما كانت التوكسينات النقية او البلورات سامة للحشرات فان خليط من الجراثيم والبلورات فى الغالب تعطى اعلى موت. اوضح الباحثان شيسر وبولا (١٩٧٨) سمية جراثيم Bt لحدودة قرون الدخان (ماندوكا سيكشا). بالنسبة لحشرة جاليريا ميللونيللا ادى الاستخدام المنفصل للجراثيم (مع ٠,٠١% بلورات) وبلورات (مع ٠,٣% جراثيم) من Bt جاليريا ، ايزاوايا و وهانسيز الى حدوث سمية متوسطة بالمقارنة مع مخاليط ١:١. بالاضافة الى ذلك فان طفرة Bt ايزاوايا غير البلورية كانت غير سامة مما ادى الى الاقتراح بان نشاط الجراثيم قد يتسبب عن الكمية الصغيرة من البلورات التى تلوث مستحضر الجراثيم (اسا واخرون ١٩٨٧). على العكس من ذلك وجد ان البلورات بدون جراثيم ميسنة ذات تاثير قليل. اضافة ٠,١% من الجراثيم الى البلورات زادت من نسبة الموت فى ٦٤% من اليرقات من ٣٦% موت مع ٠,٠٠١% جراثيم الى البلورات. هذه النتائج مع الجيلاريا ميللونيللا اظهرت اهمية الجراثيم والبلورات كخليط ولم يحدث ذلك مع عدد من الافات التابعة لرتبة حرشفية الاجنحة (ناقون ١٩٩٣ ، واخرون ١٩٨٧). لقد وجد لى وليو (١٩٨٩) انه بينما التركيزات العالية من الجراثيم كانت سامة للجياريا ميللونيللا وابى دقيق امكرب كانت توجد كميات كبيرة من البروتين فى الجراثيم والبلورات التى لا توجد فى الطفرات والسلالات غير البلورية الغير عنيفة مع هاتين الحشرتين مما ادى الى الاقتراح بان هذا يرجع الى وجود التوكسينات الخاصة فى اغلفة

الجراثيم التي ترتبط بالعنفوانية. اظهر موار واخرون (١٩٨٩) ان المزارع الكلية كانت اكثر سمية عن البروتينات البلورية كراى ١ ، كراى ٢ ، من سلالات Bt كورسناكى فيما عدا التوكسين الداخلى لسلالة HD-1.

الفصل الثاني

تأثير بكتيريا الباسيلليس على الميكروبات واللافقاريات غير المستهدفة

مقدمة: أظهرت الاختبارات المعملية على اللافقاريات ان بكتيريا الباسيلليس ذات تأثيرات محدودة على الكائنات غير المستهدفة. بالرغم من المدى العوائلى العريض للعديد من سلالات Bt فإنه لا يوجد شك فى ان بعض التأثيرات غير المستهدفة من جراء استخدام بكتيريا الباسيلليس سوف تحدث. مثال ذلك ان أكثر من ٣٠٠ نوع من الحشرات حرشفية الاجنحة سجلت على انها حساسة لواحدة على الأقل من سلالات الباسيلليس كورستاكى. لقد خلص الباحثون الى ان معدلات الاستخدام والكائنات المستهدفة من التطبيق والاختلافات الوراثية فى حساسية مجاميع الحشرات ومختلف العوامل البيئية وسلوك التغذية فى الحشرات كلها تساهم فى تقليل التأثيرات غير المستهدفة فى الحقول. دراسات النظم البيئية على حشرات حرشفية الاجنحة اوضحت بعض التأثيرات غير المستهدفة للباسيلليس كورستاكى ولكن هذا لم يكن كافيا للوقوف على خطورة اى نوع تحت التقييم ولم تظهر التأثيرات فيما وراء موسم معين. بكتيريا Bt امنة على ديدان الارض والعناكب والنحل عندما تستخدم بالمعدلات الحقلية الا اذا كان المنتج يحتوى على زيادة من التوكسين الخارجى. توكسينات Bt ليست ضارة على النباتات ولو انه فى الامكان ان بعض المستحضرات قد تحتوى على مكونات ضارة على النباتات phytotoxic.

بعد الرش الجوى ونجاحاته مع هذه الوسيلة الحيوية اصبح هناك مجال كبير لدخول Bt فى المجارى المائية والآن تستخدم بعض تحت الانواع (مثل الاسرائيلية) ضد يرقات البعوض ويرقات الذباب الاسود فى الماء. لقد تم فحص عدد محدود من الدراسات للوقوف على تأثيراتها فى المجتمعات المائية وقد وجدت تأثيرات دنيا فقط من Bt اسرائيلينسىز ، تينيريونيسى وكورستاكى. لقد اوضح استعراض عدد من الدراسات عن تأثير استخدامات Bt مع مفترسات وطفيليات الحشرات ان Bt نادرا ما يحدث اضرار. على العكس تم احلال Bt بدلا من المبيدات الحشرية الكيميائية فى برنامج مكافحة الروتينى زادت اعداد مفصليات الارجل النافعة. هذا مع ان المنافسة على العوامل وخفض جودة العائل قد تؤخر بشكل غير مباشر من تطور المفترسات او الطفيليات او تسبب الموت المبكر لها قبل النضج. خلاصة القول ان الباسيلليس تعتبر بوجه عام ذات فائدة كبيرة فى برنامج ونظم السيطرة والادارة المتكاملة للافات.

الوضع التاريخي والمشاكل في الدراسات على الكائنات غير المستهدفة:

الاستعراض المرجعي عن التأثيرات غير المستهدفة لاستخدامات Bt تحتوي في الغالب على كم هائل من الاستنتاجات والمقولات عن امان رش مستحضرات الباسيلليس وبوجه عام ينظر اليها على انها امنة في معظم المواقف والظروف ولا يوجد ما يشير الى انها تؤثر على مجاميع الكائنات الحية غير المستهدفة. هذا المنظور يعكس النشاط العريض عن فعالية المبيدات الكيميائية المستخدمة في وقت الحاجة والتي يتبني على المستوى القليل من المعرفة عن التأثيرات على الكائنات غير المستهدفة. لقد اخذ في الاعتبار ان الباسيلليس كانت ذات تخصصية مفيدة على حشرات رتبة حرشفية الاجنحة. في فترة التسعينات ثار كثير من الاهتمام حول تخصيص الباسيلليس خاصة ما يرتبط بتأثيراتها على الكائنات الحية المعرضة لاكثر تحت الانواع الشائعة الاستخدام هما الكورسناكي والاسرائيلينسيس. التأثيرات غير المستهدفة ترتبط مباشرة بمدى الحشرات الحساسة. لقد تناول العديد من البحوث دراسة تأثيرات Bt على الانواع غير المستهدفة او الانواع النافعة قبل المفترسات والطفيليات والنحل وديدان الارض. التأثيرات غير المستهدفة تقاس اما مباشرة بواسطة التقييم الحيوي او غير مباشرة من خلال مستوى النظام البيئي/المجتمع.

هناك عديد من المشاكل والاعتبارات تجابة استعراض التأثيرات غير المستهدفة من الدراسات المرجعية المنشورة. كما نوقش قبلا فان جرعة Bt ترتبط مباشرة بالسمية وقد وجد ان بعض الكائنات الحساسة مع الجرعات العالية جدا قد تكون غير حساسة مع المعدلات الحقلية. في حالات اخرى فان الجرعات العالية تؤدي الى تثبيط التغذية حتى في الكائنات ذات التحمل النسبي. لذلك فان الدراسات في حاجة الى التقييم على اساس الجرعات الخقلية. هذا ليس ممكنا دائما حيث ان بعض الدراسات استخدمت توكسينات منقاه او مستحضرات تجريبية او لم تعطى اى اشارة الى الجرعة الحقلية. هناك مشكلة اخرى في استقراء التأثيرات مع الكائن الذي يلامس الباسيلليس. في بعض الحالات فان الكائنات التي اظهرت حساسية لباسيلليس خاص قد لا يستحب ان تظهر في نفس المنطقة كافة واجبة المعاملة. كذلك فان Bt التي تدخل البيئات مثل المجارى المائية من السريان في معظم الحالات يحدث لها تخفيف نسبي بالمقارنة بالمستويات المستخدمة في الاختبارات. لذلك فان تعريف التأثيرات غير المستهدفة قد تصعب من الدراسات المعملية وحتى من الحقلية كذلك. هذه العوامل في حاجة للتقييم عند دراسة التأثيرات غير المستهدفة للباسيلليس.

التأثيرات الضارة على النباتات: Phytotoxicity

من النادر ان تجد تقرير يشير الى حدوث تأثيرات ضارة على النباتات من جراء استخدام الباسيليليس. فى تقرير واحد (sharma وآخرون ١٩٧٧) ثم فيه استخدام البيتا-اكسوتوكسين ثورينجنيسين A وتحت وحدات البروتين دلتا-اندوتوكسين من Bt وقد وجد الباحثون حدوث تأثير خفض فى الانقسام الميتوزى للخلايا المرستيمية فى جذور البصل وهذا قد يرجع الى استطالة الخلايا وطول فترة الجيل. فى المقابل لا توجد تقارير أخرى تشير الى التأثيرات الضارة على النباتات من استخدام الباسيليليس او المنتجات المعتمدة على Bt. التأثير الضار على النباتات تحدث كثيرا مع المستحضرات التى تحتوى على التوكسينات Bt منفردة او خلايا منفردة كما ان بعض مكونات المستحضر قد تكون ضارة على النباتات. لم تظهر تقارير عن التأثير الضار لمعاملات Bt على نباتات الدخان وعلى جودة الياف القطن والمحصول ومحتوى زيت عباد شمس وثمار الافوكادو وتكوين اشطاء البطاطس. لم تظهر ايه تأثيرات ضارة على ما يزيد عن نباتات عديدة فيما يزيد عن ١٠٠ تجربة فى الصوب لقد اشار فالكون (١٩٧٣) ان معاملات Bt لم تتداخل مع فسيولوجى نبات القطن. لقد قطعت اللجنة المنوطة بالتسجيل فى وكالة حماية البيئة الامريكية USA EPA من ان Bt ليس له ايه تأثيرات ضارة على حياة النباتات الارضية ونصف المائية وحتى النباتات المائية كذلك (EPA ١٩٩٨).

الكائنات الدقيقة Microorganisms:

لقد اظهرت العديد من الدراسات تأثيرات تضادية للباسيليليس ضد الكائنات الدقيقة الاخرى. لقد وجد يودينا وبيرتسيفا (١٩٩٧) ان الاندوتوكسين لباسيليليس تينيريونيس يحدث تأثير حيوى مضاد على ثلاثة من بين اربعة انواع من الميكروكوكاى المختبرة. لقد اشار نفس الباحثان فى نفس السنة كذلك الى النشاط الحيوى المضاد antibiotic activity لتحت انواع الباسيليليس اماجينيسز ونوفوسبيريك ووهانيسنيز ضد بكتريا ميكروكوكس اورانتياكس والاروبيتا كاروتوفورا ، ستربتو مايسيز كريس وماليس. لقد قام الباحث Visser وآخرون (١٩٩٢) بفحص تأثير ديبييل ١٧٦ (Bt كورستاكى) على الكائنات الدقيقة فى التربة وعمليات التحلل. لم يكن هناك تأثير على تنفس الميكروبات والكتلة الميكروبية والعمليات الاخرى مثل تحليل السليوز مع مستوى المعدلات الحقلية الموصى بها. عندما يستخدم معدل ١٠٠٠ مرة عن المعدل الحقلى زادت معدلات التنفس والكتلة الحيوية بمستويات اعلى عن المقارنة بينما عمليات الفترة وتكوين الامونيوم انخفضت بعد

تحصين ٨ أسابيع. لقد كانت التجارب خلال وقت قصير نسبياً كما أنه لا يستحب ان تحدث تغييرات فى العمليات الميكروبية بعد استخدام الباسيلليس كورستاكى قد تتسبب بواسطة انبات Bt وقد تتسبب عن مكونات المستحضرات فى المنتج المعتمد على البتروليم (Visser وآخرون ١٩٩٤).

الباسيلليس اسرائيلينسيس يمكن ان تجهز فى صورة كبسولات دقيقة فى تجاويف البروتوزوا "تيتراهمينا بيريفورس" ولو ان هذا كان فى مرحلة التجريب الا انها يمكن ان تستخدم كوسيلة قتل لبعض (Zaritsky وآخرون ١٩٩١) فى دراسة مبكرة اتضح ان بروتوزوا التربة لم تتأثر باضافة Bt (Casida ١٩٨٩).

اللافقاريات Invertebrates:

كوليمبولا Collembola:

لقد قام ايسون وهولمز (١٩٩٥) بفحص تأثير الباسيلليس كورستاكى (ديبيل ٨ إل، ٨ ايه أف) على كولومبولا التربة candida Folsomia فى احدى دراسات النظام المعروف ميكروكوزم. فى البداية زادت مجاميع الكولومبولا فى التربة غير المعاملة وفى التربة التى عوملت بالمستحضرات للباسيلليس (Dipel 8L). التعداد فى الميكروكوزم المعامل بالف مثل التركيز البيئى الفعال للمستحضر المبني على الزيت (Dipel 8L) ظلت منخفضة جدا خلال فترة التجارب بالرغم من ان المجموع لم ينخفض حتى الصفر فى اى من المكررات. مع مقارنة تأثير مستحضر به زيت فقط خلص الباحثون الى ان التأثيرات السالبة مع هذا المستوي العالى جدا ترجع الى الزيت عنه بسبب الباسيلليس كورستاكى نفسه. هناك تقنيات عديدة يمكن ان تفسر التأثيرات الضارة لمستحضرات Bt الزيتية على الكولومبولا مثل التأثير السام المباشر او الخنق Suffocation. اظهرت الدراسات على التوكسينات المنقاه ان الجرعات الواطية من توكسينات Bt الاربعة (Cry 1Ab, Cry 1Ac, Cry 2A, Cry 3A) لم تخفض من فترة المعيشة او التكاثر فى انواع الكولومبولا المختلفة فى المعمل.

القواقع والقشريات:

بوجهة عام فان القواقع والقشريات غير حساسة للباسيلليس Bt مع المعدلات الحقلية باستثناء يرقات مولينسيا بلنترالس. لقد سبب المستحضر التجارى Bt اسرائيلينسيس نسبة

مسوت عالية عما حدث مع المقارنات المقتولة بالحرارة مما يجعل من هذا الاختبار حساس جدا (Gornly واخرون ١٩٩٦). الدراسات الاخرى التى شملت القواقع لم تظهر سمية للسلالة الاسرائيلية على القواقع والمحار وبلح البحر. قوائم الكائنات الحساسة التى اعدّها تريج ولانجينسبروش (١٩٨١) اظهرت ان اوستيريا ايموس ذات الصمامان وغيرها حساسة للبكتيريا الاسرائيلية. البروتين المنقى Cry 2A الابادى على الحشرات فى باسيليس كورستاكى اختبر ضد واحد من القشريات دون ان يظهر اى تأثير ملحوظ (Sims ١٩٩٧). العديد من منتجات بما فيها Bitoxibacillin الذى يحتوى على البيتا-اكسوتوكسينات قد اختبرت ضد ثلاثة من انواع القواقع ولم يثبت وجود اى تأثير سام للبكتيريا Bt عليها.

النيماتودا:

النيماتودا الممرضة للحشرات لم يثبت ما يفيد بوجود حساسية مباشرة لها تجاه الباسيليس. الطور العدى الشاب للنيماتودا الممرضة للحشرات من اجناس نيوبلاستنا، سستينيرينما ، هيتيروابديتس لم تحدث له اضرار من جراء المعاملة بباسيليس سانديجو (ثينبيريونيس) ، اسرائيلينسيز وكورستاكى (Baur واخرون ١٩٩٨ -b....). لقد عرف منذ ما يزيد عن ٣٠ عاما ان بعض النيماتودا المتطفلة داخليا حساسة للباسيليس ثورينجيسيز (بينوك ١٩٩٤). المستحضرات التى تمثل الطرز السيرولوجية للباسيليس كانت سامة على بعض النيماتودا الرمية حيث تراوحت الجرعة النصفية القاتلة LD50 من ٠,٠٩ وحتى ٧١ ميكروجرام بروتين كلى/مليلتر ولكنها لم تظهر سمية على النيماتودا السافعة. فى نفس الدراسة اتضح ان بيض ٦ انواع اخرى من النيماتودا (حرة المعيشة ومنطافات حيوانية) كانت حساسة للباسيليس الاسرائيلية مع LD50 تتراوح من ٠,٣٨ - ٧,١ ميكروجرام بروتين كلى/مليلتر. من بين النيماتودا المتطفلة على النباتات كان خروج الشباب فى نيماتودا تعقد الجذور صفر عادة عندما كانت كتل البيض تعامل بالثوروسيد بتركيزات ٠,٢٥-١% (Bt كورستاكى) وحتى بعد ان تنقل الى الماء (كاهاال وكاهال ١٩٩٣). بينما كانت السلالة الاسبورجينية من Bt كورستاكى غير فعالة ضد النيماتودا حرة المعيشة (Panagrellus sp.) الا انها كانت عالية السمية ضد النيماتودا المتطفلة على النباتات. المستحضرات التى اختبرت قد تكون مجتوية على التوكسين الخارجى حيث ثبت ان هذا الاكسوتوكسيد يؤثر على العديد من انواع النيماتودا.

تضاعف نيماتودا عيش الغراب انخفض بشكل معنوي بعد التعرض للتوكسين الخارجى للباسيلليس فى الاسيتون (Cayrol 1974). لقد سجل الاكسوتوكسين على انه سم قاتل للنيماتودا تعقد الجذور وغيرها وليس ضد النيماتودا الممرضة للحشرات نيوابلكتانا كاربوكاسبى. لقد اتضح ان الباسيلليس الاسرائيلية تؤثر على نمو مجموع النيماتودا مرة المعيشة *Turbatrix aceti* (Meadows وآخرون 1990) كما انها تضعف من أغلفة بيض النيماتودا. لقد تم تسجيل توكسينات الباسيلليس القاتلة للنيماتودا (Narva Patented وآخرون 1991 تحت رقم براءة اختراع واحتكار اوروبية Eur.patent 0462721 A2، A.J. Sick وآخرون 1994 تحت براءة امريكية Us patent 528130 وغيرها). هذا بالرغم من عدم وجود Bt قاتلة للنيماتودا على المستوى التجارى كما انه ليس هناك مركب تحت التطوير. ان ضرورة الازابة المسبقة للبلورة التوكسين بسبب الحجم الصغير على النيماتودا تحقيق استخدام الباسيلليس ضد النيماتودا.

العناكب Spiders:

لم تظهر التقارير ايه تأثيرات سالبة فى الدراسات على العناكب. لقد تمت دراسة مستحضرين Bt (ثوروسيد 16B وديبيل 4L) على العناكب فى غابات Maine 1980 (هليبرن وجيننجز 1988). بعد الرش الجوى بالديبيل والثوروسيد بمعدلات 9,35 ، 5,8 ، لتر/هكتار تم اصطياد 12 عائلة ، 42 جنس ، 62 نوع من Araneane فى مصائد مستورة خطية. مقارنة العناكب التى تم اصطيادها قبل الرش وبعد الرش اظهرت عدم حدوث خفض معنوي فى متوسط التعداد من جراء المعاملات بالباسيلليس. فى تجارب الصوب التى استخدمت فيها المعاملة بالمبيدات الكيميائية الحشرية لمكافحة افات حرشفية الاجنحة وتم فيها احلال المبيدات بالباسيلليس زانت من اعداد العناكب. لقد فشلت الدراسات الاخرى العديدة فى اظهار ايه تأثيرات على العناكب بعد معاملات Bt فى الاتحاد السوفيتى سابقا. مستحضر Bt ثورينجبيسز المسمى Bitoxibacillin استخدم ضد افة اشجار الغابات ديكوميرسي مارجينيللا فى اوكرانيا ولم يسبب ايه تأثيرات ضارة على عناكب Linyphiid (Zelener 1982). العديد من منتجات الباسيلليس Bt (وتحت الانواع) التى استخدمت فى مولدوفا لم تسبب ايه تأثيرات معاكسة على العناكب (Sklyarov 1983). العناكب عبارة عن مفترسات اجبارية تتغذى اساسا على الحشرات ومن ثم قد تكون حساسة للتغيرات فى اعداد الافة/الضحية من جراء استخدام الباسيلليس

Bt. فى برنامج ميداني فى غابات غرب وسط صين ادت استخدامات الديبيل والثوروسيد الى زيادة اعداد وسيادة ووفرة انواع العناكب الناتجة بينما ظلت عناكب القنص دون تغيير. الاعداد الكلية للعناكب بعد الرش لم تتغير بشكل معنوى عما كان الوضع قبل استخدام Bt.

الحشرات والاكاروسات: Insects and Mites

الاكاروسات:

هناك قليل من التقارير عن الكائنات الارضية غير المستهدفة اوضحت الحساسية فى المعمل للبكتريا Bt الاسرائيلية. انواع الاكاروسات اظهرت حساسية للباسبيليس اسرائيلينسيس عندما اعدت فى المعمل (Temeyer 1984). لقد تم اصدار قوائم بواسطة كبريج ولانجنبروش (1981) تشمل عدد من الدراسات التى اظهرت ان الاكاروسات غير حساسة للباسبيليس ثورينجسينز ونفس الحال مع الاكاروسات المفترسة التى ثبت عدم حساسيتها لتحت انواع Bt. لقد كان هناك استثناء واحد فقط مع الاكاروس المفترس M.occidentalis الذى ثبت انه حساس لمستحضر Bt.tenbrionis على صورة مسحوق قابل للبلل بمعدل 0.1 ، 0.5 ، 1 مرة مثل المعدل الموصى به (0.9 كجم مادة فعالة / 75.7 لتر لكل اكر) (شابمان وهوى 1991).

الحشرات المائية: Aquatic insects

اظهرت العديد من الدراسات حساسية الحشرات المائية غير المستهدفة لمستحضرات الديبيل. لم يسبب استخدام الديبيل بالمعدلات الحقلية اى موت على يرقات الحشرة المائية هيداتوفلاكس ارجيوس. لقد اشار الباحث Kreutzweiser وآخرون 1992 ان الحشرات المائية من رتب ايفيميروبترا ، بليكوبترا ، تراكوبترا لانتاثر مباشرة باستخدام الديبيل حتى مع التركيزات العالية (100 مثل المعدل الموصى به). لقد لوحظ تاثير معنوى (30% موت) فى نوع واحد فقط من رتب 12 نوع تعرضت لمعدل 600 وحدة دولية/مليلتر (ذبابة الحجر T.nivalis) ولكن هذا التركيز يمثل حافة الامان حيث انه يقارب 100 مثل التركيز البيئى المتوقع فى 50 سم ماء. مجموع ذبابة احجار اخرى Leuctra ternis انخفض بشكل معنوى (70%) بعد استخدام Bt كورسناكى للماء المتدفق فى كندا ولو ان التحليل الحيوى باستخدام المادة النباتية لم يظهر ان Bt كورسناكى كانت سامة L. tenius مما ادى الى الاقتراح بوجود سبب اخر. لقد خلص الباحثون الى

عدم وجود تأثيرات ضارة من مستحضرات Bt على الحشرات المائية. الاستثناء الوحيد كان مع السلالة الاسرائيلية ضد بعض حشرات ثنائية الاجنحة اساسا من عائلات Chironomidae ، Dixiidae ، Simulidae ، Culicidae وغيرها.

دراسات معملية على حشرات حرشفية الاجنحة: Lepidoptera

بسبب ان العدد الاكبر من الدراسات على Bt اجري على السلالات الفعالة ضد حرشفية الاجنحة فان عدد انواع الحشرات داخل هذه الرتبة الذي سجل في القوائم على انه حساس للبكتريا Bt كبيرا بشكل واضح. بالرغم من هذا الوضع فان اكثر من ٢٠٠ نوع من حرشفية الاجنحة سجلت على انها غير حساسة على الاقل لواحد من الصنف السيرولوجي لبكتريا Bt بالمقارنة بما يقارب ١٥٠٠ تقرير عن الانواع الحساسة للطرز السيرولوجي للباسبيليس ثورينجسيز. التباين بين السلالة/تحت الانواع يعتبر من العوامل الهامة التي يجب ان تؤخذ في الاعتبار مع دراسة التأثيرات غير المستهدفة لل Bt بسبب ان السمية تعتمد على الاندوتوكسين والاكسوتوكسين. حتى في داخل جنس واحد من الحشرات فان الاختلافات في الحساسية داخل الجنس سجلت. الاختلافات فيما بين الاجناس في الحساسية وحيث في اجناس كاتوكالا وانواع الليثوفان حيث سجلت بعض الانواع على انها حساسة والبعض الاخر غير حساس. في المعمل سببت Bt كورستاكي (Foray 48B) موت ملحوظة في ٢٧ من بين ٤٢ نوع من حرشفيات الاجنحة والتي توجد كيرقات في وقت الرش لمكافحة الفراشة الفجرية (Pacock وآخرون ١٩٩٨). لقد وجد الباحثون ان الاربعة انواع من ابي دقيق المختبرة كانت عالية الحساسية بالمقارنة بعشرة من بين ٣٨ نوع من الفراشات. في بعض الحالات وجد ان الموت يتاخر في الحدوث مع قليل من موت اليرقات ولكن لم تستمر ايام الحشرات المعاملة حتى طور الحشرة الكاملة. هذا الموت المتأخر قد لا يمكن اكتشافه في تجارب التفرقة الروتينية في المعمل والتي تؤدي الى تقديرات عن تأثيرات Bt اقل من الواقع.

التأثيرات غير المستهدفة لاستخدامات Bt ذات اهتمام كبير عندما تؤثر على الانواع تحت الخطر. ابي دقيق L.melissa.samuelis الخطير كان حساس للباسبيليس كورستاكي في المعمل خاصة مع المعدلات العالية الحقلية (Herms وآخرون ١٩٩٧). نوع اخر من ابي دقيق الجميل Danaus plexippus اظهر حساسية منخفضة لل Bt في المعمل حتى مع ضعف التركيز الحقل. لقد كانت الحشرة مثار الاهتمام في الفترة الاخيرة

خاصة بعد ان نشر Losey وآخرون ١٩٩٩ الى ان حبوب لقاح الذرة المهندسة وراثيا التي تعبر عن التوكسين على اوراق حشيشة اللبن قتلت حوالى ٥٠% من اليرقات بعد اربعة ايام من التغذية. الدراسة لم تحدد بشكل كمى كمية التوكسين التي استخدمت وكانت مثار جدل كبير بسبب قلة التفاصيل. الدراسة التي اجراها Leong وآخرون ١٩٩٢ اشارت الى قليل من الحساسية في الفراشات البالغة للمستحضر جافيلين (Javelin Bt) كورستاكي) و MVP (التوكسين في الكبسولات) مما ادى الى الاقتراح بان الرش على مجموع الحشرات خلال البيات الشتوى يجب تجنبه بسبب قلة الموت المتوقع. لقد قام الباحثان هاشن واوبريكي ١٩٩٩ بفحص تأثيرات حبوب اللقاح المهندسة وراثيا على Bt على يرقات الحشرة بوضع حشائش اللبن فى اصص بالقرب من حاقل حقل الذرة المهندس وراثيا. ثم نزع عينات من الاوراق وتعرض اليرقات الحديثة الفقس D.plexippus فى المعمل. بعد ٤٨ ساعة سجلت نسبة موت ١٩% على اليرقات على الاوراق التي تعرضت للقاح او حبوب لقاح Bt بالمقارنة بصفر موت مع النباتات المتحولة. لقد اوضحت هذه الدراسة ان الفراشة تأثرت عكسيا بواسطة الباسيلليس ثورينجيسنيز خاصة عندما تكون الحشرة فى طور اليرقة. لا يعرف ما اذا كان سلوك الحشرة فى الحقل مثل الحركة بعيدا عن الاوراق الملوثة قد يقلل او يخفف من التأثيرات.

سمية التوكسينات المنقاه للحشرات والاكاروسات:

تختلف سمية التوكسينات المنقاه من كل المنتجات التي تعتمد على الجراثيم والبلاورات. الاندوتوكسينات تختلف فى السمية على مجموعة من انواع حرشفية الاجنحة حيث ان عدد من التوكسينات قد تحدث فى خلية بكتيرية او بلورة فردية. لذلك فان السمية التي تحدد لسلالة او عزلة يمكن ان تكون اوسع من التوكسينات المنخفضة عندما ينظر اليها بشكل فردى ولو ان التوكسين الذي يتناول قد يكون عالى فى الكمية حيث ان التوكسين الفردى ينتج بالهندسة الوراثية عنه فى المنتجات. لقد اصبحت الاختبارات على عدد من الكائنات غير المستهدفة باستخدام البروتينات المنقاه اكثر شيوعا مع التركيز الواضح على استخدام Bt فى النباتات المهندسة والمتحولة وراثيا. مثال ذلك بروتين Cry 2A المنقى من باسيلليس كورستاكي اختبر ضد ٣٥ نوع من الحشرات تمثل رتب غمدية وثنائية ونصفية وغشائية ومتساوية وحرشفية ومستقيمة وشبكية الاجنحة والكولومبولا وقد اتضح ان انواع حرشفية وثنائية الاجنحة فقط كانت حساسة (Sims ١٩٩٧). لقد استخدم ماكنوش وآخرون (١٩٩٠-١) منتجات ذات جين منفرد من الباسيلليس كورستاكي

Cay1Ac: HD-1: Cay1Ab and Hd-73 وكذلك للباسبيليس تينبيروينيس (Cay3A) ضد الافات الحشرية (١٧ نوع تغطي ٥ رتب) والاكاروس. لقد وجد ان *L. decemlineata*, Chrysomelid فقط كانت حساسة للبروتين Cry3A مع تركيز نصفى قاتل LC50 يساوى ٦,٥ ميكروجرام/ملييلتر. من الدراسات المثيرة التى استخدم فيها الباسبيليس كورستاكى فى المعمل والتى اظهرت ان بعوض *Aiaegypti* حساس ولو انه فى بعض الاحيان كانت هناك حساسية ولكن قليلة (جونسون ودافيدسون ١٩٨٤). لقد اظهر الصرصور الالماني درجة منخفضة من الحساسية للباسبيليس كورستاكى فى دراسات اخرى (ساندو وفارما ١٩٨٠ ، زاكويسكي ١٩٩٥).

الانواع النافعة BENEFICIAL SPECIES :

الاعداء الطبيعية Natural enemies:

من الاهمية تقييم تاثير سلالات Bt والتوكسينات الخاصة على الاعداء الطبيعية. فى الغالب يتم تعظيم تواجد اقتراب Bt من منظور وزاوية انه بديل امن صديق للبيئة عن المبيدات الحشرية التقليدية ، هذا بسبب انها تعتبر متوافقة ولو جزئيا مع الوسائل الحيوية للمكافحة او الوسائل التى تحدث طبيعيا مثل اشباه الطفيليات والمفترسات (سندو جراس وستاديلباكير ١٩٩٤). لقد نشرت الكثير من الدراسات المرجعية عن تاثيرات تحت انواع Bt ومنتجاتها على المفترسات والطفيليات. الدراسات المبكرة التى اجريت قبل ١٩٧٦ والتى استخدمت فيها الباسبيليس كورستاكى فى مستحضرات مجهزة فى الحقول وفى وجود المفترسات و/او اشباه الطفيليات اشارت وخلصت الى عدم وجود صورة كاملة عن تاثير Bt خاصة على الطفيليات (Forsberg وآخرون ١٩٧٦). منذ ذلك الحين اشارت العديد من الدراسات الى الامان النسبى لل Bt على المفترسات والمتطفلات فيما عدا التأثيرات الخاصة بالتنافس. مستوى تخصص سلالات Bt عادة يعضد هذه الاستنتاجات ولو انه احيانا تسجل بعض حالات الموت غير المستهدفة على الاعداء الطبيعية. لقد قامت مجموعة العمل المعنية "بالمبيدات ومفصليات الارجل النافعة" التابعة للهيئة الدولية للمكافحة الحيوية بفحص التأثيرات غير المستهدفة لعدد ٤٠ مبيد فى ٦ دول باستخدام طرق الاختبار القياسية ضد عدد من المفترسات والطفيليات. لقد خلصت المجموعة الى ان الباسبيليس كورستاكى لم تظهر ايه تاثيرات ضارة على معظم مفصليات الارجل وتمت التوصية باستخدامها فى برامج مكافحة المتكاملة (Hassan وآخرون ١٩٨٣).

فى العديد من برامج مكافحة الافات لم تظهر استخدامات الباسيلليس Bt اية تأثيرات ضارة واضحة على المفترسات والطفيليات. مثال استخدام Bt ضد *L. decemlineata* فى مولدوفا لم تظهر اية اضرار على معقد الاعداء الطبيعية (بما فيها ٢٦ الخنافس، ١١ ابي العسيد، ٣ اسد المن) (نوفوزيلوف ١٩٩١). بعد سنوات طويلة من الرش المكثف بالمبيدات ثم رش بساتين الفاكهة بمستحضرات Bt (باسيلليس ثورينجنسيس - بيتوكسى باسيلليس، باسيلليس ديندروليمس - ديندرو باسيلليس، باسيلليس جاليريا - اندوباكتيرين، باسيلليس اليسنى - BIP) فى مولدوفا حدثت زيادة فى الاعداء الطبيعية مع زيادة فى مكافحة الطبيعة للافات (Sklyarov ١٩٨٣). على نفس المنوال عندما استخدمت Bt (بما فيها باسيلليس كورستاكى) لأول مرة فى مكافحة الافات فى بساتين الخضر فى الصين حدثت زيادة فى الاعداء الطبيعية للمن بينما ادى استخدام المبيدات الحشرية الى نقص واضح فى الاعداء الطبيعية (Lu وآخرون ١٩٨٦). لقد اتضح ان استخدام BT يتوافق مع الاعداء الطبيعية.

المفترسات الحشرية: Insect predators

المفترسات الحشرية من الوسائل الخاصة بالمكافحة الطبيعية للافات الحشرية على نفس نسبة المبيدات الحشرية التى لا تضر بالمفترسات. المفترسات فى الغالب تهاجم العديد من الافات الحشرية. لذلك فان اى وسائل مكافحة تخفض اعداد المفترسات قد تؤدى الى حدوث وباء او فوران فى تعداد الافات غير المستهدفة. بشمول واسع وجد ان Bt نادرا ما تحدث تأثيرات سامة مباشرة على المفترسات عندما تستخدم بالجرعات الحقلية. الدراسات المرجعية اشارت الى حدوث عدم سمية او قليل من الضرر حيث اتضح ان ٧٠ تقرير فى جملة ٨٧ اوضح عدم حدوث اية اضرار على المفترسات. التقارير الاخرى اشارت الى خفض فى اعداد بيض المفترس ونقص فى تناول الغذاء وتأثيرات على نمو ووضع بيض فى الحشرات الكاملة وكذلك تاخير حدوث الموت فى الجيل التالى مع حوريات المفترس ونقص الخصوبة وحدث تأثير تعقيم مؤقت (Petrova and Khrameeva ١٩٨٩).

لقد اتضح التأثير السام المباشر للباسيلليس تينيريونس ضد مفترس الاكاروس ميتاسيلليوس اكسيد نيتاليس (شابمان وهوى ١٩٩١). لقد ثبت ان المعاملة بمسحوق قابل للبلل من هذه البكتريا بالمعدل الحقلى الموصى به ٠,٩ كجم مادة فعالة / ٧٥,٧ لتر/اكر او اقل كانت اكثر سمية على المفترس من الاكاروس العائل نفسه. لقد كانت السمية عالية عندما تم تجريع اناث المفترسات لمدة ٢٤ ساعة قبل المعاملة وربما يرجع ذلك الى شرب

محلول الرش. انبثاق المفترسات التي استمرت في الحياة كبيضة وتطورت في وجود المحلفات لم تظهر اى نقص معنوى في الخصوبة. انواع الضحية تيترا نيكس بورنيكا ليست هي الافة الكبرى للمحاصيل التي استخدمت عليها Bt تينيريوينس بشكل تقليدى والتي قد تحدد من التعرض المفترس لمحاليل الرش ولكنها محدودة الدور كمتغذيات على النباتات والسبب قد توجد عرضيا وفي بعض الاحيان على المحاصيل المعاملة. هناك حالات جديدة اظهرت فيها الدراسات المختلفة على نفس المفترس نتائج متضاربة كما حدث مع اسد المدينة. فى بعض الحالات قد يكون هناك تأثير غير مباشر لبكتريا الباسيلليس Bt على المفترسات. ابي العيد نو السبع نقط *C. septempunctata* حدث به موت ٦٣% عندما وضع لمدة ٦ ايام على اشطاء البطاطس مع المنة الذى غمس فى محلول ١% نوفونور (باسيلليس تينيريوينس) (لا نجينبروش ١٩٩٣) بينما وجد نفس الباحث (١٩٩٢) عدم حدوث تأثير غير مباشر على يرقات ابي العيد. اظهرت العديد من الدراسات عدم حدوث اية تأثيرات او قليل منها على ابي العيد بعد استخدام Bt.

اشباه الطفيليات Parasitoids:

بوجه عام فانه عندما تكون الحشرة العائل غير حساسة لبكتريا Bt لا يلاحظ اية تأثيرات على اشباه الطفيليات المرتبطة بها (Wysoki وآخرون ١٩٧٥، Johnson وآخرون ١٩٨٠). استخدامات Bt كورسناكى ضد حشرات حشرية الاجنحة فى العادة لا يخفض من معدلات التطفل فى الحقل حيث يجعل من ادخال Bt اقتراب ووسيلة تتوافق مع استخدام اشباه الطفيليات وادخالها فى برنامج مكافحة او تلك التى توجد طبيعيا. فى بعض الاحيان يظهر التحليل الحيوى فى المعمل حساسية منخفضة للبكتريا Bt ونادرا ما يلاحظ هذا الوضع فى الحقل. لقد نشر حدوث تأثير مباشر بواسطة حامد فقط ١٩٧٩ مع دياريجمبا ارميلانا ، بمبلا تورينبوليلا وغيرها عندما تناولت ١٠^٥ جراثيم/ملليتر والبلورات المرتبطة فى عصارة الغذاء مما ادى الى قتل اشباه الطفيليات. لقد تم الكشف عن وجود عدد كبير من الخلايا الخضرية لبكتريا Bt ميكروسكوبيا فى هيموليمف ومعدة اشباه الطفيليات الميتة. القليل من اشباه الطفيليات خرج من اليرقات والعذارى للعائل عندما تغذت اليرقات على اوراق البرقوق الملوثة بالباسيلليس كورسناكى عما هو الحال عندما تغذت على اوراق غير معدية. لقد نشر تقرير واحد يتعارض مع كل الدراسات حيث سجل ١٠٠% موت للسترايكوجراما بواسطة دندروباسيلليس (تولستوفا ولونوفار ١٩٧٦) على عدد من العوائل بينما الدراسات كلها لم تثبت اية تأثيرات جانبية معاكسة.

ففي بعض الحالات زادت معدل التطفل بأشباه الطفيليات بعد المعاملة ببكتريا Bt عندما قورنت بالقطع التجريبية غير المعاملة (Hamel ١٩٧٧، Nealis وآخرون ١٩٩٢). لقد أشار بحاث آخرون إلى زيادة وتحفيز التطفل بواسطة ابانتيليس ميلانوسيلليس على ليمانتاريا رسيبار بعد المعاملة بالديبيل ٤ إلى بمعدل ١٩,٨ وحدة دولية للهكتار. اليرقات المتطفل عليها كانت ذات استجابة سالبة للضوء ولا تأتي في تلامس مع الباسيلليس كورسناكي كما في اليرقات غير المتطفل عليها موجبة الاستجابة للضوء مما يشير إلى أن عوائلها كانت غير معرضة للباسيلليس كورسناكي. كما هو الحال مع المفترسات أظهرت العديد من الدراسات عدم حدوث أية تأثيرات ضارة على أشباه الطفيليات من جراء المعاملة بالبكتريا باسيلليس Bt. هذا بينما تؤدي معاملة العوائل بالباسيلليس إلى حدوث تأثيرات معاكسة على أشباه الطفيليات اليرقية بسبب زيادة موت اليرقات التي مازالت موجودة على العوائل والتي تحملت المعاملة أو بسبب خفض حجم أشباه الطفيليات الباقية (Monnerat and Bordnt ١٩٩٨). إذا كانت ببكتريا Bt تقتل العائل بسرعة جدا فإن شبيهة الطفيل لا يجد مصدر كافي كي يستمر في الحياة. مثال ذلك ما يحدث مع دودة البراعم ابانتيليس فورميفيرانيا حيث انخفض التعداد بمقدار ٥٠-٦٠% بسبب نقص خروج الطفيليات قبل موت العائل. حدوث خفض في إنتاج البيض وتكوين الشرانق وطول حياة الطفيليات البالغة ينتج من جراء تغذية الحشرة العائل بالبكتريا Bt قبل أن تهاجم بالطفيل (سلامة وآخرون ١٩٩١). التأثيرات على طول فترة حياة العائل سجلت مع كثير من العوائل خاصة خنافس الفول من جراء المعاملة بالبكتريا Bt ولم يثبت ذلك مع ذباب التاكينا.

وسائل مكافحة الحيوية للحشائش: Weed biocontrol agents

حيث ان الحشرات تستخدم كوسائل حيوية لمكافحة العديد من انواع الحشائش يصبح في الامكان ان تؤثر بكتريا Bt على كفاءتها. لقد ظهرت قليل من الدراسات التي تناولت بشكل مباشر التأثيرات على وسائل مكافحة الحيوية للحشائش. في اوريغون تم اجراء اختبارات على الوسيلة الحيوية *Tyria.jacobarae* لمعرفة حساسيتها للباسبيليس كورسناكي. في تجارب التغذية في المعمل كانت اليرقات الاولى غير حساسة بينما كانت يرقات العمر الرابع والخامس ذات تركيزات نصف قاتلة LC50 تساوي (0.3 ، 0.22 ، 0.12 ملليجرام مستحضر لكل مليلتر (بيبل HG ، كفاءة 4320 وحدة دولية/ملجم). لقد ادت النتائج عن التجارب المعملية والحقلية الى الاقتراح بان الباسبيليس كورسناكي قد تقلل من تأثير الوسيلة الحيوية في جاكوبيا ولو ان استخدام Bt كورسناكي ضد الافات المستهدفة لا يتزامن ولا يتوافق مع الاطوار الحساسة للوسائل الحيوية في مكافحة (James) وآخرون (1993 - b). الوسيلة الحيوية *Neochetona eichhorniae* ضد ورد النيل لم تكن حساسة لواحد وعشرين سلالة Bt تابعة لاثني عشر تحت نوع). البيتا اكسونوكسين كانت مائعة للتغذية ولكنها غير سامة (Haag and Boucias 1991). حساسية الحشرات التي تستخدم في مكافحة الحيوية في حاجة الى الدراسة من مفهوم كل حالة بحالتها ولكن ليس هناك سبب للاقتراح او القول بان وسائل مكافحة الحيوية تكون اكثر حساسية عن الحشرات الاخرى غير المستهدفة.

ديدان الارض Earth worms:

هناك قليل من التقارير اشارت الى تأثير بكتريا الباسبيليس على ديدان الارض ولو انها معتبرة لا فقاريات غير مستهدفة في اختبارات حزم التسجيل مع فرضية عدم وجود اية تأثيرات (EPA). لقد استخدم الباحثان سميرنوف وهيمبل 1961 الثوروسيد في التربة بجرعات عالية جدا (10⁴ - 10⁶ × مرة اعلى من المستويات العادية ووجدوا ان البكتريا Bt قاتلة على ديدان الارض *L. terrestris* اوضحت دراسة لاحقة ان المستحضرات التجارية للباسبيليس كورسناكي (بيبل) عندما استخدم بمعدلات 60 ، 600 ، 6000 ملجم/م² (المعدل الموصى به في الحقل 60 ملجم/م²) والباكتوسين بمعدل 30 جم/م² لم تخفض اعداد ديدان الارض في رماد الغابات بالمقارنة في الاعداد في القطع التجريبية التي عوملت بالماء فقط (بنز والتريج 1975). لقد اجريت تجارب على المستحضرات

الاولى من الثوروسيد والتي كانت مبنية على الباسيلليس ثورينجينسيز والتي كانت تحتوى فى الغالب على البيتارا اكسوتوكسين كما هو الحال مع معظم مستحضرات Bt فى امريكا التى كانت تحتوى على هذه التوكسينات الخارجية قبل عام ١٩٧٠. لقد ثبت من التجارب ان الباسيلليس كورستاكى غير المجهزة والديبيل المائى 8AF بتركيزات اكثر ١٠٠٠ مرة من المتوقعة فى البيئة لم تظهر ايه تأثيرات معاكسة.

الدراسات فى النظم البيئية Ecosystem studies: المجتمعات الميكروبية المائية:

لقد قام الباحث Kreutzweiser وآخرون (١٩٩٦) بفحص تأثيرات الباسيلليس كورستاكى (ديبيل) على نشاط المجتمعات الميكروبية على الاوراق فى النظم المائية المصغرة microcosms. لقد استخدم الباحث نوعين من مستحضرات الديبيل (64AF, 8AF) مع التركيز المتوقع فى البيئة (EEC) بعد الرش بمعدلات من ١٠٠-١٠٠٠ مرة مثل التركيز المتوقع. لقد اتخذت معايير قياس كثافة الخلايا البكتيرية والبيروتوزوية والتنفس الميكروبي والتحلل للوقوف على تأثير استخدام الباسيلليس كورستاكى. لقد اظهرت الدراسة زيادة فى التنفس الميكروبي بينما نقص التحليل وكان النقص معنويا مع تركيز ١٠٠٠ مثل التركيز البيئى المتوقع (EEC). لقد خلص الباحثون ان الباسيلليس كورستاكى التى تلوث المجارى المائية لا يكون لها ايه تأثيرات ضارة معنوية على المجتمعات الميكروبية.

اللافقاريات:

لقد درست سمية بكتريا Bt على العديد من اللافقاريات (الكاروس-النيماودا-الكولمبول-غشائية الاجنحة) التى تسكن التربة وكان الربط بين الجرعة وما يحدث فى الحقل نادر التناول وفى العديد من الحالات كانت تحت انواع Bt المختبرة غير مستخدمة فى برامج مكافحة الافات فى شمال امريكا (ايسون-١٩٩٣). لقد ادى استخدام الديبيل (Bt كورستاكى) فى المانيا الى حدوث زيادة كبيرة فى خروج الحشرات الكاملة من رتبة ذات الجناحين دون ايه تأثيرات سلبية على مفصليات الارجل غير المستهدفة والتى تعيش فى التربة (ويرنك وفونك ١٩٩٥). المصائد التى وضعت تالية لاشجار الدردار فى واكوتا اظهرت تأثيرات قليلة من جراء استخدام الباسيلليس على معظم العائلات التى تم اصطليادها مثل ساركو فاجيدى ، كوركسينيسيدى، كاليفوريدي، ستافيلينيدي (Frye وآخرون ١٩٨٨).

في الفلبين اظهرت التجارب ان الباسيلليس كورستاكي (ديبيل) ليس له اثر باقى فعال على ١٥ عائلة من الاكاروسات بما فيها اكروسات التربة والاكاروسات المفترسة في مخلفات الارز المتحللة (Sayaboc وآخرون ١٩٧٣). ولو انه في دراسات اخرى ظهر ان بعض الاكاروسات حساسة في المعمل. في اوربا قام Sklodowski (١٩٩٦) بدراسة تأثير المبيدات المختلفة (فوراي-تريبون-ديسيز-ديميلين) في مكافحة فراشة النن على الخنافس Carabid. لقد وجد انه بينما تقل اعداد الخنافس في الخريف بعد رش كل المواد مقارنة بالقطع التجريبية غير المرشوشة كان لمستحضر مبيد Foray (باسيلليس كورستاكي) تأثير قليل على مجتمعات الخنافس بشكل شامل. تنوع الانواع كان كبيرا للغاية في المساحات التي تم رشها بالفوراي. لقد اظهرت تجربة اخرى في كاليفورنيا ان Bt كورستاكي والزيت احدثت بعض التغيرات في تعداد عديد من الانواع.

حرفية الاجنحة:

لقد اظهرت العديد من الدراسات على الباسيلليس كورستاكي حدوث تأثيرات على حرفيات الاجنحة بعد المعاملة ... بعد استخدام بكتريا Bt في الغابات اظهرت العديد من الدراسات حدوث خفض معنوي في اعداد الحشرات الكاملة ويرقات حرفية الاجنحة في عام التطبيق مع امتداد بعض الخفض في السنة التالية وفي الانواع التي حدث فيها استمرار لحياة الاطوار الحساسة في السنة السابقة لظهور الحشرات الكاملة. التأثيرات التي سجلت كان لها فترة دوام محدودة والتي قد ترجع الى نقص ثبات وعدم تكرار استخدام الباسيلليس في الحقول. ادى استخدام Bt كورستاكي في غرب فرجينيا لمكافحة الفراشة الغجرية L. dispar الى حدوث نقص معنوي في حرفيات الاجنحة في عام التطبيق (ستيو وآخرون ١٩٩٥). لقد شملت هذه الدراسة حوالي ٩٠ نوع من حرفيات الاجنحة مع ٢٠٠ من مفصليات الارجل وقد اتضح ان التأثير كان محدودا على حرفية الاجنحة الموجودة على النباتات وقت الرش. وجد الباحث انه لم يحدث تأثير معنوي على الانواع التي وجدت بعد الرش كما لم تظهر اية تأثيرات على الانواع غير الحرفية الاجنحة. تحصل الباحث Wagner وآخرون ١٩٩٦ على نفس التأثيرات بعد معاملة واحدة من Bt (٩٠ وحدة دولية/هكتار) على حشرات حرفية الاجنحة في غرب فرجينيا في سنة المعاملة وبعد سنتان من الشفاء. لقد كانت وفرة اليرقات فوق المجموع الخضري قليلة في القطع التجريبية المعاملة ولكن الاختلافات كانت غير معنوية عن المقارنة. لقد اشارت الدراسات ان معظم الانواع التي تأثرت شفيحت في السنة الاولى بعد الرش. ثم قياس مدى

انجراف الباسيلليس كورسيتاكي في يويافى الفترة من ١٩٨٩-١٩٩٣ باستخدام C.sheridanic, I.fotis كدلائل (Whaley وآخرون ١٩٩٨). لقد أجرى رش جوى بمستحضر ديبيل 6AF المائى بواسطة الطائرة الهليكوبتر بمعدل ٥٩ وحدة دولية/هكتار. لقد تم تسجيل حدوث وفيات فى حشرات حرشفية الاجنحة التى تغذت على النباتات العوائل التى تعرضت للرش على بعد ٣٠٠٠ متر من موقع الرش مما يوضح عدم الاهتمام بالتأثيرات غير المستهدفة خارج منطقة الرش.

المجتمعات المائية وفى الاعماق Benthic and aquatic communities:

تأثير تلوث المجارى المائية ببكتريا Bt من الامور ذات الاهتمام الكبير مع الافات التى تهاجم المحاصيل التى تعيش فى المنطقة المحيطة او المغمورة فى الماء. بينما درس الامان على الكائنات غير المستهدفة مع بكتريا Bt اسيرائيليسينز والتى استخدمت فى الماء وقد اشارت قليل من التقارير الى امان انواع اخرى من البكتريا على الكائنات غير المستهدفة فى الماء. ان تأثير البكتريا الاسرائيلية على مفصليات الارجل غير المستهدفة فى الماء يكون محدودا للغاية. الاستخدام طويل المدى للبكتريا الاسرائيلية ضد البعوض (Shnetter وآخرون ١٩٨١) والهاموش (فى افريقيا) (برنامج مكافحة Onchocerciasis) اظهر عدم حدوث تأثيرات على الحشرات غير المستهدفة. لقد تناولت الدراسات العديدة الاخرى لقاء الضوء عن التأثيرات غير المستهدفة للبكتريا الاسرائيلية ولم تظهر ايه تأثيرات ضارة. لقد اظهرت التجارب المعملية بعض التأثيرات (جارسيا وآخرون ١٩٨٠). بعد استعراض العديد من الدراسات إتضح ان مخاطر البكتريا الاسرائيلية كانت محدودة على بعض حشرات Nematocera مثل البعوض والهاموش. لم تكن كل انواع الهاموش حساسة وكان حد الامان كبيرا فى بعض الحالات. لقد وجد ان C. Plu mosus كانت حساسة للباسيلليس الاسرائيلية فقط مع جرعات اعلى كثيرا من تلك المستخدمة فى الحقل (Molloy ١٩٩٢). اظهرت برقات الهاموش حساسية منخفضة وفى بعض الحالات لم تلاحظ ايه تأثيرات على تعداد الهاموش تحت الظروف الحقلية (Miura وآخرون ١٩٨٠). حيث ان السلالة الاسرائيلية تمثل اساس عدد من المنتجات الفعالة ضد حشرات ثنائية الاجنحة فان الامان لهذه السلالة يعتبر من الاعتبارات الاولى. مع منتجات Bt مثل الكورسيتاكي وايزاوايا فان تأثير المعاملات على الحشرات المائية لم تؤخذ فى الاعتبار فى العديد من الدراسات. لم تظهر كثير من التجارب والملاحظات الميدانية ايه

تأثيرات ضارة. لقد سجلت زيادة في كثافة الانجراف مرتان عما كان الوضع قبل المعاملة. لقد حدثت تغيرات قصيرة الامد في تركيب المجتمع ولم يثبت اى تغير معنوى في التنوع التقسيمي بعد معاملة Bt كورستاكي. لقد حدث خفض معنوى في ذبابة الاشجار فقط (L.tenuis) بحوالى ٧٠% ولو ان التحليل الحيوى لم يثبت ايه سمية على الزبابة على الاوراق المعاملة بالباسبيليس كورستاكي. لقد اشار الباحثين الى ان الخفض في تعداد ذبابة الحجر فى الحقل بالرغم من انها لم تكن حساسة فى المعمل قد ترجع الى التداخل مع الوسائل الاخرى والتي تزيد من السمية على هذه الحشرة او الى عوامل اخرى غير معروفة لا علاقة لها بالباسبيليس كورستاكي.

اظهرت بعض الدراسات المبكرة فى كينجزبيرى (١٩٧٥) عدم حدوث ايه تأثيرات معاكسة على الحشرات المائية بعد الرش الجوى ببكتريا Bt كورستاكي فى اونتاريو. مرة اخرى استخدام مستحضرات الكورستاكي بمعدل ٥٠-٥٠٠ وحدة دولية/هكتار لفحص التأثيرات غير المستهدفة فى مستعمرات اللافقاريات المائية (ريتشاردسون وبيرنير ١٩٩٤). الباسبيليس كورستاكي لم تؤثر على الكثافة او تركيب لافقاريات الاعماق بعد سبعة ايام من المعاملة.

استعراض للوضع والرؤى فى وكالة حماية البيئة الامريكية EPA

لقد تم توصيل البيانات عن حساسية الحشرات غير المستهدفة والتي تحصل عليها من العديد من الدراسات من الشركات الى الوكالة الامريكية EPA US بهدف تعضيد التسجيل. الملخص الذى اعدته الوكالة على تأثيرات Bt كورستاكي ، اسرائيليسينز ، تينيريونيس ، ايزاوايا اظهرت عدم حدوث تأثيرات سامة او قليلة على حشرات غشائية وغمدية وشبكية الاجنحة وغيرها. لقد خلص التقرير ان الدلتا-اندوتوكسين للباسبيليس Bt ليس له ايه تأثيرات ملحوظة على اللافقاريات المائية (المياه العذبة) (EPA ١٩٩٨). لقد سجل التقرير قائمة بالاطوار غير الكاملة والبالغة من العديد من الحشرات مثل ذباب مايو والرعاشات والخنافس والهاموش على انها غير حساسة ولا تتأثر باستخدام Bt. لقد اظهر التقرير سمية عادية (مرجعية الى متوسطة الى عالية على الدافنيا (لافقاريات المياه العذبة) خاصة مع باسبيليس ايزاوايا (جدول ٢-٣). اظهرت قيم التركيزات النصفية القاتلة فتم ما بين ٥٠ وحتى ٥٠٠ جزء فى المليون مما يوضح ان الباسبيليس كورستاكي واسرائيليسينز متوسطة السمية على الدافنيا بينما Bt ايزاوايا كانت عالية السمية. السمية ترجع لعوامل اخرى بخلاف الدلتا-اندوتوكسين (يفترض ان تكون اكسوتوكسينات). لقد اشترطت التشريعات انه لتحقيق الامان يجب العناية الفائقة بمحتويات البطاقة الاستدلالية وعمليات

الانتاج وذلك لتفادي الاخطار والاضرار على اللافقاريات المائية (EPA 1988). لقد تمت الإشارة الى ان اللافقاريات البحرية لا تتأثر كذلك باستخدام مستحضرات الباسيلليس Bt.

وثيقة EPA ركزت الاضواء على مشكلة واحدة في مقارنة التأثيرات غير المستهدفة لمستحضرات Bt: نسبة المادة الفعالة في المنتجات. معدلات استخدام Bt في التجارب مدونة في جدول (2-3): الجرثيم/جم غذاء، جرثيم/مليلتر، جزء في المليون ppm، الغذاء كجزء في المليون، مضاعفات المعدل الحقل، CFU/g غذاء، لتر/CFU، ملجم او جم/لتر او ميكروجرام/نحلة. بعض هذه المعايير غير ذات معنى خاصة الجرثيم/مليلتر (عادة مع ما يصاحبها من البلورات) كما انه في كثير من الحالات لا تؤثر الجرثيم على السمية. معظم الاصطلاحات لا ترتبط بشكل مباشر مع كمية التوكسين التي تتناول بواسطة الكائنات الحية مثل غير سامة من الناحية العملية.

سمية التوكسينات الخارجية على الكائنات غير المستهدفة:

السمية على الكائنات غير المستهدفة لم تظهر مع الدلتا-اندوتوكسين عندما فصلت من وسط النمو البكتيري (EPA 1998). هذا ولو ان عدد من المنتجات البكتيرية Bt من عمليات التخمر اختبرت مع جرعات عالية وظهرت سمية داخلية على الكائنات غير المستهدفة. اظهرت بعض الدراسات التي استهدفت معرفة المسئول عن النشاط غير المستهدف وما اذا كانت اعداد المواد الذائبة المقاومة للحرارة التي تلوث المادة الفعالة (الببتا-اكسوتوكسين ثابتة حرارياً). لقد حدثت تأثيرات سامة في برغوث الماء دافنيا ماجنا (قشريات دقيقة) ونحل العسل وبعض الحشرات النافعة والاسماك والتدبيات (الجرذان والفسران). لقد ثبت ان الدافنيا كانت دليل اكثر حساسية للكشف عن السمية في الاختبارات السريعة. لقد وجدت المواد السامة في السائل الرائق المفصول من الدلتا-اندوتوكسينات ولم تظهر اى سمية بواسطة الاكسوتوكسين الثابت حرارياً بسبب التخلص من التأثيرات السامة بواسطة التعقيم الاوتوكلافي. لقد وجدت شوائب سامة قد تنهار بالحرارة وقابلة للذوبان في مستحضرات Bt كورسناكي وايزاوايا واسرائيلينسيز وقد توجد في اصناف اخرى. لقد اظهرت منتجات Bt ايزاوايا تأثيرات سامة كبيرة على الكائنات غير المستهدفة.

جدول (٢-٣): الحساسية غير المستهدفة: ملخص البيانات التي أرسلت للوكالة EPA بفرض التسجيل NOEL (مستوى التأثير غير الملحوظ)، NOEC (التركيز الذي لا يحدث تأثيرات ملحوظة، nontoxic غير سام، toxic سام).

| Organism | Bt subspecies | Result |
|--|---------------|---|
| Predaceous Neuroptera | Kurstaki | NOEL = 3000 ppm Practically nontoxic at 1×10^8 cfu/g food for 9 days; NOEL = 1×10^8 spores/g doet Practically nontoxic at 1.2×10^8 cfu/g food for 9 days; NOEL = 1.2×10^8 spores/g doet Slightly toxic: 10X field rate resulted in 18% mortality |
| Parasitic Hymenoptera | Kurstaki | Practically nontoxic at 3000 ppm of food for 15 days; NOEL = 3000 ppm Practically nontoxic at 2.4×10^8 spores/ml diet for 23 days; NOEL > 2.4×10^8 spores/ml diet Practically nontoxic at 1×10^8 spores/ml diet for 30 days; NOEL > 1×10^8 spores/ml diet |
| | Israelensis | 30-day $LC_{50} > 7.9 \times 10^7$ CFU/G DIET |
| | Tenebrionis | NOEL = 100 ppm |
| Predaceous Coleoptera | Kurstaki | NOEL = 1500 ppm, slightly toxic Practically nontoxic at 2.4×10^8 spores/ml diet for 28 days; NOEL > 2.4×10^8 spores |
| | Israelensis | 9 day LC_{50} 1.8×10^8 cfu/g diet |
| | Aizawai | NOEL = 10.000 ppm & NOEL = 1566 ppm |
| Aethropod predators and parasites | Kurstaki | Slightly toxic (6.2 g/l resulted in 12-21% mortality) Toxic; 10X field rate resulted in 100% mortality within 6 days |
| Honeybee | Kurstaki | 48-hour $LD_{50} > 23.2$ mg/bee; NOEL = 7.7 mg/bee 48-hour $LD_{50} > 23.2$ mg/bee; NOEL = 7.7 mg/bee 10-day LC_{50} 118 mg/bee (consumed) No significant effects noted at 10X field rate |
| | Aizawai | Highly toxic: $LC_{50} = 15$ ppm |
| | Israelensis | 5 day $LC_{50} > 7.0 \times 10^7$ cfu/g diet |
| | Tenebrionis | NOEL = > 100 ppm (100X field conc.) in 18 da test |
| Green lace-wing larvae | Israelensis | 16 day $LC_{50} > 1.5 \times 10^8$ cfu/g diet; 16 day NOEL = 2.5×10^4 cfu/g |
| | Aizawai | NOEL = 10.000 ppm & Toxic to larvae at 10X field rate |
| Earthworm | Tenebrionis | NOEC = > 100 ppm (120X in 1 kg soil) in 14 day test |
| Predatory mite (freshwater invertebrate) | Aizawai | 1X field rate resulted in 24% corrected mortality |
| | Kurstaki | Moderately toxic; 21 day LC_{50} is between 5 ppm and 50 ppm & Aqueous $LC_{50} > 4.9$ ml/l |
| | Israelensis | Moderately toxic; 21 day LC_{50} is between 5 ppm and 50 ppm |
| | Tenebrionis | 48 hour $EC_{50} > 100$ mg/l |
| | Aizawai | Highly toxic; 21 day NOEC = 6.4×10^8 cfu/l |

الفصل الثالث

تأثير الباسيليليس على الفقاريات Effects on Vertebrates

مقدمة: اظهرت الدراسات المعملية عن الامان على الفقاريات خطر قليل جدا من جراء التعرض المباشر للباسيليليس. اتضح ان Bt قليلة السمية جدا على الاسماك والبرمائيات. لم تشير التقارير او الدراسات الى حدوث تأثيرات مباشرة على عدد من انواع الطيور سواء فى المعمل او بعد الاستخدام الحقلى. التأثيرات غير المباشرة على الطيور اكلة الحشرات وبعض الثدييات الصغيرة تشمل التغير او التحول فى الطعام. خفض مجاميع حشرية الاجنحة بعد التطبيق الميدانى الحقلى للباسيليليس ادت الى تقليل عدد العشوش التى تبنيها الطيور فى بعض الانواع ولكن هذا التأثير لم يصل الى تقليل عدد الفراخ فى كل منطقة توالد فى نفس سنة استخدام البكتريا او فى السنوات المتتالية. لقد ادى الاستعراض المرجعى عن سمية بكتريا Bt على الثدييات بواسطة وكالة حماية البيئة الامريكية EPA الى الاستنتاج بعدم حدوث تأثيرات معاكسة فى دراسات السمية الحادة على الثدييات الصغيرة. بعد التجريب الفمى والرئوى كانت الجراثيم تخرج او تصفى من الحيوانات بسرعة جدا بدون حدوث اية تأثيرات معاكسة. لقد لوحظت بعض الوفيات فى الفئران بعد الحقن اليربوني بالجرعات العالية (10^6 cfu/حيوان) ولكن نفس السلالات اظهرت عدم سمية مع الجرعات الواطية 10^7 cfu/حيوان او اقل. اظهرت مقارنات الجرعات العالية من البكتريا عدم وجود سمية كما فى الباسيليليس سبتيليس والتى قد تسبب موت اذا استخدمت مع جرعات تزيد عن 10^6 cfu/حيوان.

بالرغم من الاستخدام الواسع لسنوات طويلة للمنتجات المبنية على الباسيليليس وجد قليل من الارتباط مع المشاكل الصحية فى الانسان وقد سجل ان حالات العدوى السريرية ببكتريا الباسيليليس فى الانسان نادرة الحدوث بشكل بلغت للنظر. لقد سجلت حادثتان فى الصحة المهنية بسبب التعرض للباسيليليس مما ادى الى حدوث حالات مرضية استدعت العلاج بالمضادات الحيوية. لقد امكن استرجاع عزلات Bt من المرضى نوى الجروح شديدة الحرق ولكن هذه العزلات كانت مختلفة عن تلك التى استخدمت فى التجهيزات التجارية. اظهرت دراسات السمية التى اجريت حديثا على الطرز السيروولوجى Bt تونكوكسيان ان بعض العزلات على الاقل فى نظام النموذج المناعى فى الفئران قد تحدث عدوى وتكرر مشابه لما يحدث مع B. cerens. استكشاف المزارع الصحية والبكتيرية

المجموعة روتينيا في المجتمعات المعرضة للباسيلليس اثار العديد من الاهتمامات. حيثما تم استرجاع بكتريا Bt من المرضى والمصابين فانه لا يمكن الجزم بانها هي سبب المرض.

انتاج التوكسينات المعدية المسببة للاسهال في الباسيلليس سيربوس بواسطة عزلات Bt اثار الانتباه والاهتمام بان Bt قد تسبب امراض معدية في الانسان gastroenteritis. لقد اجريت قليل من الدراسات حديثا واوضحت ان بعض سلالات Bt بما فيها تلك التي وجدت في العديد من المستحضرات التجارية قادرة على انتاج التوكسينات المعدية المسببة للاسهال ولكن بمستوى اقل عشر مرات لما يحدث مع سلالات B. cereus. لقد ادت الادلة المتوفرة في الوقت الراهن الى الاقتراح بعدم حدوث تسمم غذائي بسبب التلوث بالباسيلليس حيث ان الظروف الملائمة لانتاج التوكسينات غير متوفرة في المنتجات التجارية كما ان نظام التوكسين المعدى الذى ينتج بواسطة معظم السلالات منخفضة. حتى الان لا يوجد دليل صالح للربط بين استخدام Bt مع كوارث الاسهال بعد تناول الطعام. لذلك فانه من الحكمة اجراء اختبارات الغريبة على السلالات الفعالة والتجارية للوقوف على قدرتها على إنتاج التوكسينات المعدية. لقد تم تطوير نظم عديدة للتقييم الحيوى للكشف عن التوكسينات المعوية فى بكتريا B. cereus. بوجه عام اتضح ان الباسيلليس ليس لها اية مخاطر على الفقاريات. اذا اخذنا فى الاعتبار الاستخدامات المكثفة التى اجريت فعلا على Bt فى مكافحة الافات وكذلك الحدوث الطبيعى فى البيئة فان احتمالات العدوى على الادميين نادرة مما ادى الى الاقتراح بقلة المخاطر.

الاسماك والبرمائيات:

الدراسات القليلة الموجودة فى المراجع تناولت تحديد تاثيرات Bt ضد الاسماك باستخدام Bt اسرائيلينسيز فى مستحضرات متعددة والتى استخدمت فى المياه مباشرة. لم يثبت وجود تاثيرات على السمك الموجود خلال المعاملة ولا حتى فى تجارب التعرض المباشر (جدول ٢-٤). لم يؤدى استخدام الباسيلليس ثورينجسيز ضد الذباب الاسود فى ميتسجان ايه تاثيرات على الموت او على زيادة الوزن لاسماك لركباس او اعداد وانواع السمك (Merritt واخرون ١٩٨٩). اظهرت الدراسات المعملية التى اجراها Christensen ١٩٩٠، ب، ج عدم وجود تاثير معاكس للباسيلليس الاسرائيلية على السمك الشمسى ذو الخياشيم الزرقاء والسلمون عندما تعرضت لتركيز ١,٣-١,٧ x ١٠^{١٠} cfu/جرام غذاء. عند مقارنة سمية المواد القاتلة للبعوض المختلفة على اسماك

F. heteroclitus اتضح ان الباسيليليس الاسرائيلية هي الاقل سمية بين المستحضرات الخمسة التي اختبرت (Lee and Scott 1989). الجدول (٢-٥) يوضح ان الفينوكسي كارب والباسيليليس ثورينجنسيز معا كانت اكثر عن الفينوكسي كارب منفردا مما ادى الى الاقتراح بان استخدام مخاليط من وسائل مكافحة يجب ان يفحص بعناية. لقد كان Bt تينيريونيس غير سام على السمك *L. reticulata* (Mayer 1989).

اوراق التسجيل التي تجرى وتورد الى وكالة حماية البيئة الامريكية EPA شملت العديد من تحت الانواع مثل الباسيليليس كورسناكي ، تينيريونيس ، ايزاوايا واسرائيلينسيز (جدول ٢-٦). التركيز النصفى القاتل LC_{50} يتراوح من اكثر من ٨,٧ × ١٠^٩ وحتى اكثر من ٤,٦ × ١٠^٩ CFU / لتر حيث لم يثبت حدوث اى سمية او حالة مرضية فى الاسماك الموجودة فى الاختبار.

جدول (٢-٤): انواع الاسماك التي سجلت على انها غير حساسة للباسيليليس ثورينجنسيز فى التحليل الحيوى فى المعمل او بعد التعرض الحقلى.

| Fish species | Common name | Reference |
|--------------------------------|-----------------------|---|
| <i>Gambusia affinis</i> | Mosquito fish | Abbott Laboratories; Garcia et al. 1980 |
| <i>Lucania parva</i> | Rainwater killifish | Abbott Laboratories; Garcia et al. 1980 |
| <i>Gasterosteus wheatlandi</i> | Twospine stickleback | Abbott Laboratories; Garcia et al. 1980 |
| <i>Lepomis macrochirus</i> | Bluegill | Christensen 1990a |
| <i>Salvelinus fontinalis</i> | Brook trout | Wipfli et al. 1994 |
| <i>Salmo trutta</i> | Brown trout | Wipfli et al. 1994 |
| <i>Oncorhynchus mykiss</i> | Rainbow trout | Wipfli et al. 1994; Christensen 1990b |
| <i>Pseudomugil signifer</i> | Pacific blue-eye fish | Brown et al. 1998 |
| <i>Poecilia reticulata</i> | Larvivorous fish | Mittal et al. 1994 |
| <i>Tilapia nilotica</i> | | Lebrun and Vlayen 1981 |
| <i>Esox lucius</i> | | Becker and Margalit 1993 |
| <i>Cyprinus carpio</i> | | Becker and Margalit 1993 |
| <i>Perca fluviatilis</i> | | Becker and Margalit 1993 |
| <i>Ambloplites rupestris</i> | Rock bass | Merritt et al. 1989 |
| <i>Epiplatys</i> sp. | Killifish | Beck 1982 |
| <i>Cyprinoidei</i> | Goldfish | Beck 1982 |
| <i>Cyprinodon variegatus</i> | Sheephead minnow | Christensen 1990c |

جدول (٢-٥): السمية الحادة لمبيدات مكافحة يرقات البعوض على *F. heteroclitus*

| Insecticide | Mean 96h LC ₅₀ (mg/l) | 95% confidence limits (mg/l) |
|---------------------------|----------------------------------|------------------------------|
| Temephos | 0.04 | 0.02-0.05 |
| Fenoxycarb | 2.14 | 2.01-2.27 |
| Diiflubenzuron | 32.99 | 29.01-37.52 |
| Methoprene | 124.95 | 90.01-171.64 |
| VectoBac (Bt israelensis) | 980.00 | 730-1330 |
| Fenoxycarb/VectoBac | 1.55 | 1.40-1.72 |

جدول (٢-٦): الحساسية غير المستهدفة للأسماك

| Fish | Bt subspecies | Result |
|----------|---------------|--|
| Trout | Kurstaki | LC ₅₀ > 1.5 x 10 ¹⁰ cfu/l Practically non-toxic; aqueous LC ₅₀ > 4.9 ml/l and oral LC ₅₀ > 2.5 nl/g of food Practically non-toxic; with an aqueous LC ₅₀ > 4.6 x 10 ¹⁰ cfu/l of dilution water |
| | Israelensis | Aqueous LC ₅₀ > 8.7 x 10 ⁹ cfu/l; oral LC ₅₀ > 1.7 x 10 ¹⁰ cfu/g food. Slightly toxic Aqueous LC ₅₀ > 1.4 x 10 ¹⁰ cfu/l; oral LC ₅₀ > 5.3 x 10 ⁹ cfu/g food. |
| | Tenebrionis | Aqueous NOEC = 100 mg/l |
| | Aizawai | Aqueous LC ₅₀ > 3.9 x 10 ⁷ cfu/l; oral LC ₅₀ > 1.5 x 10 ¹⁰ cfu/g food 96 hour LC ₅₀ > 100 mg/l |
| Bluegill | Kurstaki | Practically non-toxic at 1.5 x 10 ¹⁰ cfu/l of dilution water and at 1.2 x 10 ¹⁰ cfu/g of food for 32 days |
| | Israelensis | Aqueous LC ₅₀ > 8.9 x 10 ⁹ cfu/l; oral LC ₅₀ > 1.3 x 10 ¹⁰ cfu/g food Aqueous LC ₅₀ > 1.6 x 10 ¹⁰ cfu/l; oral LC ₅₀ > 4.3 x 10 ⁹ cfu/g food |

أظهرت التقارير من منظمة الصحة العالمية WHO (١٩٩٢) أن الدراسات المعملية والحقلية على تأثير الباسيليليس Bt على الضفادع وسمندى الماء والسمندر والسمك العلجومي وقد اتضح عدم حدوث تأثير للباسيليليس ثورينجسيز على أنواع البرمائيات المختبرة (جلير وكالجهان ١٩٩٨) وكانت *Xenopus laevis* غير حساسة للباسيليليس ثينير يونيس (مايو ١٩٨٩).

الطيور:

إذا تكلمنا عن التأثيرات المباشرة نقول انه لم تسجل ايه سمية تذكر من جراء استخدام سلالات Bt على اى من انواع الطيور. اوضحت الدراسات المكثفة على الطيور مع الجرعات العالية من Bt الاسرائيلية غير الذائبة على صورة جراثيم وبلورات عدم حدوث ايه تأثيرات معاكسة (Meadows 1993). لقد وجد Lattir وآخرون (1990) (أب) عدم وجود سمية او مرضية او فقد في الوزن عندما اعطيت Bt الاسرائيلية عن طريق الفم بجرعات كبيرة ($3.4 - 6.2 \times 10^{11}$ cfu / كجم / يوم لمدة 5 ايام الى العصفور البنى الصغير "كولينس فيرجينيانس" والبطة البرى. اظهرت دراسات اخرى على العصافير وغيرها عدم حدوث تأثيرات معاكسة من المعاملة الفمية للباسيلليس ثورينجنسيز كما استرجعت بكتريا حية غير مهضومة من البراز. لقد خلصت وكالة حماية البيئة الامريكية EPA الى ان تحت انواع Bt كورستاكي ، الاسرائيلية ، تينبيريونيس والايوايا ليست سامة او مرضية على البط والعصافير بعد الاختبارات الخاصة بالسمية الحادة وتحت الحادة. لقد تراوحت التركيزات النصفية القاتلة LC_{50} بالباسيلليس ايزوايا من 8-16 جم/كجم لهذين النوعين من الطيور. لقد سجلت السلالات كورستاكي وايسرائيلينسيز على انها غير سامة عمليا بجرعات تتراوح من 2.5-3.1 جم/كجم/يوم عندما اعطيت للطيور لمدة 5 ايام. لم يسجل حدوث موت بعد حقنة 3 مللجم/كجم من Bt تينبيريونيس فى البط - لم تسبب Bt الاسرائيلية ايه تأثيرات ومواقع ضرر على الفراخ البيضاء والفئران فى الجانب الاخر تم استكشاف الموت فى الطيور بعد استخدام المبيدات لسنوات عديدة فى مكافحة الاصابات البائية لفراشة *L. monacha* فى الدانيمارك. بالرغم من ان مبيد الاندوسلفان حقق مكافحة جيدة (60-97%) الا انه سبب كذلك بعض الموت فى الطيور بالمقارنة بالديبيل (كورستاكي) الذى اعطي مكافحة ضد الافة 76% فى طور اليرقات ولكنه لم يسبب اى موت فى الطيور (Bejer 1986).

إذا تكلمنا عن التأثيرات غير المباشرة نقول ان اى تأثير لبكتريا Bt على الطيور اكلة الحشرات تتسبب عن نقص امداد الغذاء ولم يوجد تأثير سام مباشر. الطيور التى تغذت على الديدان فى الربيع حدث ان لاقت عدد قليل من الضحايا التى تتغذى عليها لفترة قصيرة وهذا ما يدفع الطيور للبحث عن غذاء بديل. كذلك فان عدد محاولات التعشيش فى السنة قد تقل ولكن هذا لا يؤثر بالضرورة على عدد الفراخ فى كل منطقة تكاثر فى السنة استخدمت فيها Bt والسنوات التالية (RED-EPA 1998). فى دراسات خاصة تم تسجيل

قليل من التأثيرات غير المباشرة. لم يتأثر سلوك وتكاثر الذباب النبرية (تعيش يرقاتها تحت جلد ظهور الماشية والخيول وتسبب الانتفاخ النبري) باستخدام الباسيلليس Bt الفعال ضد حرشفية الاجنحة ولو ان العشوش في القطع التجريبية المعاملة كانت بها حضنة اصغر ومعدلات فقس اقل وحقنة اقل ولكن بشكل غير معنوي (Holmes 1998). لقد خلص الباحث الى حدوث تأثيرات غير مباشرة ذات مخاطر قليلة عن الطيور المفردة باستخدام الدنروباسيلليس بمعدل ٢,٥ كجم/هكتار في غابات البلوط لم تؤثر معنويا على غذاء طائر الزرزور. بالرغم من ان مكون الغذاء يحتوي على نسبة عالية من الافات (٥٥% تقريبا). لقد درس تأثير الرش ديبييل والعذارى والباكتورسبين على مجموع الطيور في اسبانيا ولم يحدث سوى نقص بسيط ومؤقت في التعداد. لم يؤثر استخدام الباسيلليس الاسرائيلية (محببات الفيكتوباك) في جملة مكافحة البعوض على ١٩ نوع من الطيور. بالطبع حدثت بعض التأثيرات في بعض الدراسات بسبب تأثير البكتريا على كتلة الغذاء من يرقات حرشفية الاجنحة التي تتغذى عليها الطيور. في بعض الحالات تدفع الطيور لتغيير عوائل التغذية.

تأثير مستحضرات الباسيلليس على الثدييات:

تأثير الباسيلليس Bt على الثدييات الصغيرة:

١- ملخص للتقييم الخاص بالامان على الثدييات الصادرة عن وكالة حماية البيئة

الامريكية EPA

لقد اعدت وكالة EPA قاعدة بيانات تاريخية عن Bt واسترجعت في ملخص عن السمية على الثدييات من خلال الدراسات التي نشرت نتائجها بواسطة الباحثين في الوكالة. لقد اشارت الوثائق التي صدرت عن الوكالة في مارس ١٩٩٨ انه لم يثبت ايه تأثيرات صحية على الثدييات في اي من دراسات العدوى/المرضية. دراسات السمية الحادة اظهرت خمسة اماكن للتعرض بما فيها الدخول عن طريق الوريد والتي تسبب اقصى خطر. لم تظهر دراسات السمية الحادة عن طريق الفم (جرعة واحدة كبيرة) ايه تأثيرات معاكسة او علامات عدوى على الثدييات مع اي تحت نوع من الباسيلليس المختبرة تحت الجرعات الخاصة. تناول الفمى لجرعة ١٠×٤,٧ جراثيم/كجم وزن جسم والبلورات المرتبطة بها من الباسيلليس كورستاكي فشلت في احداث ايه تأثيرات سامة معاكسة في الفئران. لقد اظهرت التصفية الميكروبية ان Bt تمر خلال القناة الهضمية مع تصفية كاملة بعد يومان من التجريع. لقد تم الكشف عن اعداد قليلة من Bt عرضيا في الطحال والمعى

الأصغر ونقصت هذه الأعداد حتى الحد الممكن الكشف عنه خلال الدراسة. أظهرت دراسات السمية الحادة عن طريق الاستنشاق عدم حدوث أية تأثيرات معاكسة حتى مع تركيز $2,6 \times 10^6$ جرثومة/كجم في الفئران. لوحظ حدوث تصفية كاملة للباسيلليس من الرئتان. أظهرت دراسات الحقن الوريدي حدوث تصفية كاملة للبكتيريا بعد تخطي حاجز الجلد فقد أمكن الكشف عن Bt بعد يوم المعاملة من الدم والأعضاء الأخرى المختبرة. في اليوم الرابع حدث خفض كبير في أعداد البكتيريا في الرئتان والكلى والليمف والدم والمخ. قامت الحيوانات المعاملة بالتخلص من معظم الباسيلليس من الطحال والكبد في اليوم ٥٧. أظهرت دراسات الحقن الوريدي لبكتيريا Bt في الفئران عدم حدوث سمية أو مرضية من جراء حقن تجهيزات المواد الفعالة للباسيلليس Bt ايزاوايا ، اسرانييليسيز وكورستاكي وتينيريونيس بمعدل 10^6 ، 10^7 cfu/حيوان. لم تسجل وفيات بعد حقن سلالتى ايزاوايا مرة واحدة بجرعة 10^8 cfu/حيوان. مع هذا التركيز العالى سجلت كبر قليل فى الطحال فى ثلاثة من بين الخمسة حيوانات المعاملة. لقد عوملت تحت أنواع البكتيريا على الجلد العادى وبعد حلق الشعر فى الفئران وعلى جلد الارانب ولم تظهر اية تأثيرت معاكسة او وفيات ولا على الزيادة فى وزن الجسم. لقد لوحظت حالات التهابات جلدية تتراوح بين القليلة والمتوسطة بعد التعرض عن طريق العيون فى الارانب للعديد من تحت انواع الباسيلليس. فى معظم الحالات كان العرض الوحيد الذى لوحظ هو الهياج وكان عكسيا خلال ٧ ايام حيث حدث الشفاء دون اية تأثيرات على القرنية. هذه التأثيرات تعتقد انها تتسبب عن طبيعة المستحضر وفى الغالب تكون على صورة جافة غير مائية.

٢- دراسات معملية اضافية:

لقد درست مرضية سلالة Bt كونوكيان التى عزلت من نسيج ادمى منكرز بشدة مع معاملة فار موصف مناعيا بعد العدوى عن طريق الرئتان اى بالاستنشاق. لقد وجد ان الفئران التى عدت عن طريق الانف بمعلق يحتوى على 10^8 جرثومة/فار ماتت بعد ٨ ساعات مع ظهور اعراض سامة سريرية. لقد اظهر التشريح Autopsy وجود مواضع ضرر حاد فى الشعب الهوائية مرتبطة بقرح وضرر فى الشريان السنخي. مزارع الدم التى تحصل عليها بعد شق القلب انتجت مزارع نقية الباسيلليس Bt. العدوى او الحقن بالتركيز القليل (10^6 - 10^7 جرثومة/فار) احدثت او حفزت حدوث التهاب مع ثبات بكتيرى لمدة عشرة ايام على الاقل. لقد كانت معدلات الموت منخفضة عندما عوملت الفئران بسلالات تجارية تحصل عليها من معامل ابوت حيث حدثت وفيات فى الفئران

التي عوملت بتركيز 10^8 باسيليس كورستاكي مقدارها ٨٠% بينما سببت السلالة الاسرائيلية ٤٠% موت. لقد اظهر الفحص النسيجي مواضع ضرر متطابقة مع تلك مع التي لوحظت مع Bt كونكوكيان. هذا يعتبر اول تقرير عن اى طرز سيرولوجى قادر على قتل الفئران عندما تستخدم بتركيز عالى عن طريق الاستنشاق الرئوى وقد كان التركيز المستخدم فى هذا البروتوكول اعلى كثيرا من التركيز المستخدم فى الحقل. لقد خلص الباحثون ان الوفاة ترجع الى التوكسين الدموى الذى يماثل B. cereus كما وصف بواسطة Honda وآخرون ١٩٩١. تركيز 10^7 بكتريا/فار لم ينتج توكسين كافى لقتل الفار مما يوضح مستوى عالى من الهيموليسين مطلوب لاحداث القتل.

حقن الفئران تحت الجلد ببكتريا كورستاكي لم يؤدى لاي نكرزه او نمو بكتيرى فى الاعضاء (بيتسوب وآخرون ١٩٩١). لقد ثبت عدم حدوث تاثير من السلالات Bt التي تنتج التوكسينات المعوية. لقد اقترح Bishop وآخرون ١٩٩٩ ان القوارض قد تكون ممثلة لنموذج جيد للكشف عن التأثيرات المؤثرة لل Bt على الانسان. لا يوجد دليل على ان كمية التوكسينات المعوية الناتجة تكون كافية كى تسبب تاثيرات مرضية على الانسان. لقد قام Tsai وآخرون ١٩٩٧ بفحص التخلص من وتوزيع جراثيم Bt (سلالة غير موصفة) فى الفئران بعد معاملة فردية فى القصبه الهوائية بجراثيم $10^8 \times 1$. تنفذ الجراثيم فى الجسم تحت الرئتان وهى العملية الشائعة مع طريق العدوى هذا مع الجراثيم المعزولة ليس فقط من الرئتان ولكن ايضا من الكبد والطحال والكلى والندب الليمفاوية المعوية. لقد لوحظت التهابات فى الرئتان. لقد استمرت معيشة Bt فى الانسجة لما يزيد عن ٢١ يوم ولم يثبت حدوث انبات للجراثيم. اظهرت العديد من الدراسات فى دول مختلفة عدم حدوث تاثيرات على الثدييات الصغيرة. لقد وجد هالكوفا وآخرون ١٩٩٣ عدم حدوث ايه تاثيرات من جراء التعرض الفمى او الجلدى او عن طريق الاستنشاق لمستحضر بالموسيد (الباسيليس اسرائيليسيز) الى الفئران. لقد قام Siegel وآخرون ١٩٨٧ باختبار ستة مستحضرات تجارية للباسيليس الاسرائيلية للوقوف على السمية والعدوى على الفئران والجرذان والارانب. التعرض الفمى ($10^8 \times 4$ بكتريا / حيوان) او عن طريق الرئتان ($10^8 \times 2,05$ بكتريا/حيوان) على الفئران لم تسبب ايه وفيات. لقد ادى الحقن البريتونى لواحد من المستحضرات على الفار الى حدوث موت بينما لم يحدث نفس التأثير مع المستحضرات الاخرى. لقد احدثت السلالة الاسرائيلية مع التركيزات العالية فقط (10^8 cfu/فار) موت بنسبة عالية.

٣- دراسات حقلية على الثدييات الصغيرة:

القليل من البحوث قاموا باستكشاف تأثير معاملات Bt على الثدييات الصغيرة تحت الظروف الطبيعية. كجزء من الاستكشاف العريض لتأثير العديد من المبيدات في مكافحة دودة السراخس على الصنوبر في أونتاريو قام Innes and Bendell ١٩٨٩ باستكشاف مجموع القوارض والزبابة في قطع تجريبية معاملة (٢٠ بليون وحدات دولية/هكتار من الثوروسيد ٤٨ إل يو) وغير المعاملة. لقد تم اصطياد أربعة أنواع من الزبابة وثمانية أنواع من القوارض من خلال مصائد بعد المعاملة بالمبيدات الحشرية. لقد ظهر ان Bt لها تأثير واضح على وفرة الثدييات الصغيرة وقد دعمت هذه النتيجة عمل Buckner وآخرون (١٩٧٣) الذين وجدوا عدم تأثير للباسيلليس على خمسة أنواع من الثدييات الصغيرة في مانيتوبا. غذاء الزبابة يشمل اعداد كبيرة من يرقات الحشرات. خلال فترة ما قبل المعاملة كانت الوفرة وتركيب المجموع S.cinererris مشابهة في المقارنة والمناطق التجريبية. بالرغم من ان الوفرة الكلية للزبابة كان متشابهة بعد الرش وكانت هناك عدد قليل من ذكور الزبابة البالغة مع عدد اكبر من الشباب في المناطق المعاملة مقارنة بغير المعاملة. لقد اتضح ان هجرة الذكور البالغة زادت بشكل واضح بعد الرش. بعد الرش ثم اكل يرقات حشرية اجنحة اكثر في القطع غير المعاملة. اليرقات الصغيرة والاناث البالغة وليس الذكور البالغة للزباب غيرت غذائها من يرقات الحشرات الى ضحايا اخرين في المنطقة المعاملة. الثدييات مثل الخفافيش وغيرها والتي تتغذى على الحشرات الحساسة قد تتأثر بشكل غير مباشر من جراء خفض وفرة الغذاء بسبب رش البكتريا Bt.

تأثير الباسيلليس على الثدييات الكبيرة:

لقد تم عزل Bt من حالة قاتلة في الابقار المصابة بالتهاب الثدي (Gordon ١٩٧٧) ومع ذلك لم يجرى سوى القليل من الدراسات على الثدييات الكبيرة. لقد أجرى Hadley وآخرون ١٩٨٧ دراسة سمية حادة لمدة ٥ شهور للمبيد الحشري Bt في الاغنام. لقد تم وضع منتجات Bt الديسيل والثوروسيد مع الغذاء لمدة ٥ شهور بجرعة ١٠ مللجم/كجم/يوم (حوالي ١٠^{١٢} جرثومة/يوم). لم يظهر اى تأثير مرتبط بالمعاملة على تطور وزن الجسم او المعايير الكيميائية للتأثيرات السمية كما لم تلاحظ مثل هذه التفسيرات الشاملة. لقد وجد ان عينات الدم والانسجة التي اخذت قبل وقت قتل الحيوانات موجبة للباسيلليس.

تأثير الباسيلليس على الانسان:

لقد زاد الاهتمام في السنوات الاخيرة عن المرضية التي يحدثها الجنس باسيلليس على الثدييات ولو جزئيا بسبب ان الانواع العديدة الاخرى داخل الجنس تسبب عدوى متفاوتة في الانسان. لقد عرف منذ زمن طويل ان الباسيلليس انثراكس ممرض عنيف على الثدييات وكان يعتقد ان *B. cereus* غير ضارة بالنسبة لباسيلليس الانثراكس ولو انها ثبتت احداثها للتسمم الغذائي المتوسط كما سجلت علاقتها بحالات عدوى العيون بشكل خطير قد يصل الى حد العمى. لقد تم عزل البكتيريا من الجروح المحترقة وكذلك من اماكن عض الحشرات ومرضى التهاب السحائي (*meningitis*) (Damgaard) وآخرون (١٩٩٧ ب). حديثا تكونت قناعة لدى رجال البكتريولوجى وجود افراد غير ممرضة من جنس الباسيلليس قادرة على احداث امراض على الانسان ايضا. بالرغم من ان الباسيلليس *Bt* مستخدمة منذ ما يزيد عن ٦٠ عاما في مكافحة الافات الحشرية الا انه لا يوجد سوى القليل جدا من التقارير التي تشير الى حدوث عدوى سريرية تسبب عن هذا الكائن يعتقد الكثير في ان هذا الوضع يرجع الى التقدير الاقل من الحقيقة بسبب قصر الامكانيات الخاصة بالتشخيص في المعامل والفشل في تعريف عزلات الباسيلليس للأنواع الصحيحة وطبيعة الخلط الميكروبيولوجى لبعض العينات السريرية ورفض العزلات المحدثة لتأثيرات سريرية واعتبارها ملوثات. مثال ذلك ما اشار اليه جاكوب وآخرون ١٩٩٥ من ان عزلات *Bt* التي تسترجع من المرضى بالجروح عرفت بشكل غير صحيح على انها *B. cereus*. مازلنا في حاجة لطرق ونظم تمكن من التعرف الصحيح لعزلات *Bt* وتمكن من التفرقة بينها.

تجارب التعرض المباشر للادميين تعتبر الان عمل غير اخلاقي ولكنها كانت تجرى في الماضي. المتطوعين من البشر الذي تعرضوا للباسيلليس عن طريق تناول الفمى (٣ - ١٠ x ١٠^٩ جرثومة/يوم لمدة ٣-٥ ايام) او عن طريق الاستنشاق (١٠٠ مللجرام ثوروسيد لمدة ٥ ايام) لم يظهر عليهم اية اعراض مرضية (فيشر وروزنر ١٩٥٩). لقد سجل نفس الباحثان ١٩٥٩ وضع صحى طبيعى في ثمانية من العمال في مصنع انتاج *Bt*. لقد تعرض هؤلاء لمدة ٧ شهور متواصلة لعمليات التخمر وعمل الكعلة البكتيرية الرطبة وكذلك تجهيز المستحضر النهائي. على العكس من ذلك فان ثلاثة من مجموع اربعة متطوعين الذين تناولوا طعام ملوث صناعيا بالسلالة الروسية للباسيلليس جاليريا (١٠^٩ - ١٠^{١٠} خلية/جرام) ظهرت عليهم علامات تسمم غذائي بعد فترة تحضين ٨ ساعات (Ray ١٩٩١).

العدوى infections:

لقد حدثت حادثتان عن الصحة المهنية خلال تداول السوائل عالية التركيز في الباسيلليس Bt. لقد سجل Sample and Buettner (١٩٨٣) الى ان القرحة القرنية ترجع الى Bt بعد التعرض العرضي لعطسة من المستحضر التجارى (ديبيل ، باسيلليس كورسناكى) فى العيون التى كانت قبلا فى الفلاحين الاصحاء بعمر ١٨ سنة. العلاج بالخبناميسين تعالج القرحة. لقد اقترح سيجيل وشارولا (١٩٩٠). امكانية انه بينما الجراثيم قد يكون ثابتة فى العيون وتسترجع فانها قد لا تسبب القرحة. لم يؤخذ فى الاعتبار وضع الخلايا الخضرية حيث انها لم توجد فى القرحة. لذلك اقترح البحاث انه من المفيد اتخاذ الاحتياطات للوقاية من هذه العدوى عند استخدام المبيدات الحشرية الحيوية والى سبب اعتبارها غير ضارة على الانسان. الحادثة الثانية وقعت فى انجلترا عندما جرح طالب بحث يده بآبرة تحتوى على معلق الجراثيم وبلورات الاندوتوكسين للباسيلليس اسرائيلينسيسز (10^6 / مليلتر) مع بكتريا خضرية ملوثة A. calcoaceticus Var. anitratus والذي نادرا ما يسبب عدوى طرية فى النسيج (Warren وآخرون ١٩٨٤). خلال ساعتان فقط ظهرت الام فى الاصابع ثم حدث انتفاخ وفقد اللون. لقد حدث شفاء للمصاب بعد ٥ ايام من المعاملة بالمضادات الحيوية. لقد اجريت دراسات لاحقة على العزلات التى استرجعت من الجرح. لقد اتضح وجود مستويات متوسطة من نشاط التوكسين الخارجى بينما السلالة Acitnetobacter منفردة او مخلوطة فى المزرعة مع Bt احدثت تفاعل قوى مع النكرزة فى نظام تحليل الاكسوتوكسين. لقد اظهر راشح المزرعة المختلطة تاثير قاتل بينما لم يثبت الراشح من اى سلالة اى تاثير قاتل عندما حقن فى الوريد. لقد وجد الباحث ان التوكسين الاولىى البلورى للباسيلليس اسرائيلينسيسز يمكن ان ينشط خارج الكائن الحى بواسطة انزيمات البروتينيس فى مزارع Bt القديمة او فى رواشح المزرعة من البكتريا الغريبة.

لقد قام Damgaard وآخرون (١٩٩٧-ب) بعزل Bt من الاصابة او العدوى فى الجروح المحترقة وكذلك من الماء التى استخدمت فى علاج هذه الجروح. المصابين الذين يعانون من حروق ٣٠-٧٠% فى اجسامهم والذين يعتبرون قليلي المناعة بشكل كبير. مصدر تلوث امدادات المياه غير معروفة ولكن كان من الواضح ان عزلات Bt الملوثة لم تنشأ من مخلفات المبيدات الحيوية. الحجم الجزيئى الملاحظ للتوكسينات الاولىى التى تتضمن الدلتا-اندوتوكسينات كان يختلف عن ذلك الذى استخدم فى التجهيزات التجارية ولم يظهر ايه فاعلية او نشاط ضد يرقات ابي دقيق او يرقات البعوض اييدس اجيبثى.

بالإضافة إلى أن السلالات Bt لم تكن سوطية بينما كل السلالات التي استخدمت في تجهيز المبيدات الحيوية كانت سوطية. حديثاً قدم الباحث Hernandez وآخرون ١٩٩٨ حالة جندي مصاب بجروح معدية بالطرز السيولوجي Bt konkukian H 34 وهو طراز منشأه كوريا. حيث أنه لم يكن من الواضح ما إذا كان Bt هو مسبب العدوى أو هو ملوث بسيط فإن المقدرة المرضية لهذه السلالة على الثدييات تم فحصها في نموذج اختبار الجلد في الفئران ناقصة المناعة مقارنة بمجموعة حيوانات عادية المناعة. لقد حدثت مواضع التهابات في كل الحيوانات عندما استخدم 10^7 من حقن cfu. لقد تم استرجاع Bt من عينات الفئران ناقصة المناعة فقط. لقد أظهرت التجارب على النماذج الحيوانية مقدرة Bt كونكوكيان على إحداث العدوى ونكرزة في العضلات myonecrosis في غياب المناعة. لقد خلاص الباحثون إلى ظهور أعراض سريرية في حالة حدوث تهتك في الأنسجة.

الأمراض المعدية:

لقد اتفق على أن B. cereus ملوثة للغذاء وتشارك في بعض حالات تسمم الغذاء كل سنة (جونسون ١٩٨٤). يحدث المرض في صورتان مميزتان من الأعراض هما القيء المحفز بالتوكسين Toxin-induced emetic والاسهال المتسبب عن التوكسين المعوي للباسيلليس. لهذا السبب فإن وجود وكمية الباسيلليس سيريرس تستكشف بشكل روتيني في بعض الأغذية. لقد اقترح اندرسون وآخرون (١٩٩٨) أن الجوعة الفعالة تكون منخفضة لأقل من 10×5 جرثومة (٢٠٠ جرثومة/جم غذاء). الطرق المستخدمة حالياً لاستكشاف B. cereus في الغذاء والعينات السريرية لا تسمح بالتمييز بين B. cereus و Bt. توضع العينات في أطباق على بيئة متخصصة للباسيلليس سيريرس وعندئذ تنتشر المستعمرات على agar الدم. سلالات B. cereus تعرف بحواها غير المنتظمة وبانساج انزيم Leci thinase وعدم المقدرة على تخمير المانيتول على بيئة متخصصة. هذه الطريقة لا يمكنها التفرقة بين Bt والسيريرس على الإطلاق. لقد نجح جاكسون وآخرون ١٩٩٥ في عزل سلالات Bt من أربعة مصابون في المستشفيات والذين يعانون من التهابات المعدية. لقد كان هؤلاء الباحث هم الوحيدون الذين ربطوا بين التهابات المعدية والباسيلليس Bt وبعدها تضاربت الأقوال وقيل أن Bt قد تشارك في حالات أكثر ولكنها لا تكتشف بسبب قصور الطريقة الخاصة بإمكانية التمييز بينها وبين الباسيلليس سيريرس. حديثاً أمكن الكشف عن التوكسين المعدى في السلالات الستة من Bt التي

تستخدم في مكافحة الحشرات والتي تعتمد على الباسيليس كورستاكي (HD₁) وثلاثة اخرون) و Bt اسرائيلينسيس و Bt تينيريونيس. هذا بينما اختبار الجرعة العالية في الفئران على امتداد ثلاثة اسابيع لم تظهر اية تأثيرات ظاهرة. هذا ادى الى الاقتراح بان الفئران قد لا تكون حيوان الاختبار المناسب والحساس لدراسة التسمم الغذائي.

العديد من الدراسات الحديثة اشارت الى عزل سلالات Bt المنتجة للتوكسين المعوى من الغذاء. لقد تمكن الباحث Damgaard واخرون بعزل سلالات Bt من مختلف الاطعمة (الباستا واللبن وخبز البستا) وكانت السلالات تنتمي للطرز السيولوجي H للكورستاكي او neoleonensis. لقد ثبت ان كل السلالات تقريبا تعبر عن تأثيرات خلوية في خلايا Vero مما يعطى دليل عن نشاط توكسين معوى. لقد اتضح كذلك ان سلالات Bt المستخدمة في مكافحة الحشرات على المستوى التجارى , NB-125 , HD-567 HB1 لها تأثيرات خلوية سامة Cytotoxic على خلايا فيرو. من المستحيل تحديد اصل السلالات من اى من انواع الغذاء وهل هي Bt تحدث طبيعيا او من بقايا المبيدات الحيوية في السلع الغذائية الخام. الطراز السيولوجي لبعض السلالات المعزولة كانت كورستاكي Bt وهي الاكثر شيوعا واستخداما في مكافحة افات حرشفية الاجنحة. لقد تم عزل Bt من العديد من الاطعمة كما سبق القول مثل البسطة ، التوابل ، الحبوب والبقوليات ونفس الحال مع البكتريا B. المعوية B. cereus. لقد عزلت سلالة Bt كورستاكي من العنب الذى يستهلك ادميا وقد اقترح ان المصدر هو مخلفات المبيدات الحيوية. لقد اشار Burges (١٩٧٦ - ١) الى عسل جراثيم Bt من الاساس الشمعى ونقلها الى العسل. لقد استمرت الجراثيم فى الحياه لفترات طويلة ولكنها لم تكن قادرة على التضاعف فى العسل النظيف. لقد تاكد ان وجود Bt فى العسل يسبب تسمم غذائى. لقد تم تحديد مستوى ١% وزن/وزن فى اساس الشمع فى Bt كحد امن فى شمع الاساس فى انجلترا (Burges ١٩٧٦ - ج). لقد اقترح ان مستحضرات مكافحة الحشرات التى تحتوى على جراثيم حيه يمكن ان تثبت وتنتج توكسينات معوية قد تمثل خطر على صحة الانسان فى حالة تلوث الغذاء مما يحتم ضرورة اتخاذ الاحتياطات عند تقويم اماكن Bt كمستحضر حيوى يستخدم في مكافحة الافات على الزراعات التى تستهلك بواسطة الانسان. حتى الان لا يوجد ما يشير الى وجود دليل قوى يربط بين الاستخدام الفعلى لمبيدات الباسيليس وحوادث الاسهال المعوى بعد تناول الطعام (EPA مارس ١٩٩٨). قد توجد البكتريا B. cereus فى العديد من

الاغذية ولكنها يجب ان تتضاعف وتتكاثر فيها حتى تنتج التوكسينات المسؤولة عن الاعراض.

حوادث فرط الحساسية Hypersensitivity incidents:

بالرغم من الاستخدام الواسع للمستحضرات الحيوية المحتوية على الباسيلليس Bt سجلت حالتان فقط من الحساسية من خلال إصدارات وكالة حماية البيئة الامريكية EPA (Mc.Clintock واخرون ١٩٩٥). في حالة تاكد ان الشخص المعرض كان يعاني من مرض سابق مرتبط بالحساسية. الحالة الثانية كانت لشخص معروف عنه معاناته المزمنة طوال حياة من حساسية للغذاء. بعد التعرض لمستحضر Bt حدث صعوبة في التنفس واحتقان في الانف. المستحضر الذي تعرض له هذا الانسان كان يحتوي على كربوهيدرات خاصة ومواد حافظة خاصة معروف عنها احداثها للحساسية. البداية على هذه الحالة اشارت وخلصت الى الاستنتاج بان Bt لم تكن هي المسبب المسئول عن الحساسية.

تعرض المجتمع Community exposure:

لقد استخدمت باسيلليس Bt لسنوات طويلة في مكافحة الافات الزراعية والغابات دون اية مشاكل. معظم الباحثين في مجال امان الباسيلليس لم يجدوا سببا لعدم الاستمرار في استخدام Bt على اساس الخطر على صحة الانسان (WHO وبيكر ١٩٩٢). لقد قام Green واخرون ١٩٩٠ باستكشاف المزارع البكتيرية التي تجمع روثينيا للاغراض السريرية من الناس الذين يعيشون في منطقة رش الباسيلليس كورستاكي المستخدم في مكافحة الفراشة الغجرية في ولاية اوريجون بامريكا. على امتداد سنتان تم تعريف ٥٥ مزرعة ايجابية للباسيلليس Bt (حوالي ١٢٠٠٠ شخص في المنطقة المرشوشة) وفي ٩٥ % منها روى انها ملوثات وليست هي المسؤولة عن الامراض السريرية. في الاضرار الثلاثة الباقية لم يثبت ان Bt سبب مرض ولم يثبت له اي دور في حدوث المرضية حيث كان هؤلاء المرضى الثلاثة يعانون من مشاكل طبية. لقد اقترح الباحثون ان Bt قد يكون لها بعض الاخطار في الافراد قليلة المناعة ومن ثم يجب على الوكالات المسؤولة عن التشريعات الخاصة باستخدام وتداول الكائنات الدقيقة في مكافحة الافات ان تاخذ ذلك في الاعتبار. مع ذلك يجب توعية الاشخاص قليلي المناعة بكيفية التعامل واستخدام مستحضر

Bt وسبل حماية انفسهم من هذه المستحضرات الامنة. لقد سجلت حالتان في مواطنان امريكيا في نيويورك بسبب الرش المكثف الزائد بالمبيدات الحيوية التي تعتمد على الباسيليليس Bt مما القى ظلالا عن التأثيرات الضارة التي قد تحدث بعد التعرض بما فيها حساسية الجلد والهرش وزيادة حدوث العدوى التنفسية. لذلك يجب ان يتضمن برنامج الاستكشاف الخاص بالتأثيرات الصحية في منطقة الرش الاستمرار لمعرفة ما قد يحدث بعد الرش ولفترات ممتدة. لقد انتهى الباحثون بندرة حدوث ايه اضرار او اخطار في الادميين بسبب التعرض لمستحضرات Bt.

لقد تم تقديم بيانات عن امان الرش الجوي للباسيليليس كورستاكي في نيوزيلندا خلال برنامج مكافحة فراشة تاوك (Drobniewski 1994) والذي اطلق عليه عملية الخضرة الدائمة Operation Evergreen لقد وجدت السلطات الاقليمية المسؤولة عن الصحة عدم حدوث حالات اجهاض او ولادة اطفال قبل اكتمال النمو بسبب رش Bt كما لم تسجل حالات حساسية كما لم يزيد عدد المترددين على المراكز الصحية المحلية بسبب الرش كذلك لم تزداد حالات الحصبة او الالتهاب الحسائي الدماغى. لقد استمر برنامج الاستكشاف الصحى حتى عام 1999 فى مناطق تطبيق برنامج الرش ضد فراشة تاسوك.

السمية الخلوية للتوكسين المذاب:

لقد امكن استنتاج ان الدلتا-اندوتوكسين ليست سامة على الثدييات عندما تعامل فرديا وكذلك فى حالات ما تكون المعدة غير قلووية او يكون التوكسين غير نشيط بعد التناول. الدلتا-اندوتوكسين قد يذاب (ينشط) تحت الظروف القلووية (PH اكبر من 12) او بواسطة خليط من الظروف القلووية (PH 9-10) وظروف اختزال (Huber وآخرون 1981). مع الباسيليليس ثورينجنسيس اوضح ثوماس وايلر (1983) انه بينما بلورات الدلتا-اندوتوكسين لم تظهر سمية معتبرة فى نظام الاختبار داخل وخارج جسم الحيوان فان الدلتا-اندوتوكسين المذاب فى وسط قلووى كانت سامة خلويا Cytotoxinc لخمسة خطوط مزارع خلوية للثدييات (الخلايا الليمفاوية الاولى للخنافس ، الخلايا فى الجرذان ، الخلايا السرطانية الطلانية فى الفار). بلورات البروتين الذائبة سبب تحلل دموى فى كرات الدم الحمراء الجرذان والفاران والاغنام والاحصن والادميين. الحقن الوريدي لبلورات التوكسين المذابة فى الجرذان بجرعة 15-30 ملجم بروتين/جرام وزن جسم ادى الى حدوث شلل سريع تبعة الموت خلال 12 ساعة. الحقن تحت الجلود سبب وفاة الفئران لرضيعة خلال 2-3 ساعات. لقد قام Cheung وآخرون 1985 بفحص تأثيرات الدلتا-

اندوتوكسين المذاب في القلوى من الباسيليس اسراييلينسيس عندما حقن في الجرذان. لقد سجلت سمية عالية في داخل الجسم *invivo* بمعدل ١-٥ جزء في المليون (ملجم توكسين / جم وزن جسم طازج). الاعراض التي ظهرت على الجرذان تماثل ما تحدثه التوكسينات العصبية العضلية وهي تشمل فقد اليقظة والتنفس غير الهادئ كما تفقد بعض الحيوانات نشاط الأرجل الخلفية. نتائج الاختبارات على كرات الدم الحمراء الادمية خارج الجسم اشارت ان البكتريا الاسرائيلية المنتجة للبروتينات البلورية الابادية على الحشرات امنة على الانسان عند ملامسة البوتينات ولكنها غير امنة عند ذوبانها (راني وبالارمان ١٩٩٦).

الباب الثالث

العوامل البيئية وعلاقتها بثبات وسمية ونقل وانتشار بكتيريا الباسيلليس في المستحضرات الحيوية لمكافحة الآفات

مقدمة: بعد أن انتهيت من الباب الثاني جال في خاطري أن أشير إلى بعض النواحي الخاصة بالميكروبيولوجيا التطبيقية وهو عنوان الكتاب من تأليف ومراجعة أساتذتي العظام أ.د. عبد الوهاب عبد الحافظ . أ.د. محمد الصاوي محمد مبارك، أ.د. سعد علي زكي محمود رحمة الله والصادر عن المكتبة الأكاديمية، ١٩٩٦ ولكني أثرت الاستمرار في الاستطراد المنطقي وهو دور العوامل البيئية على ثبات مستحضرات بكتيريا الباسيلليس وفعاليتها على الحشرات ونقل وانتشار الكائن الحيوي الممرض البكتيري وكذلك علاقة البيئة بأداء مخاطب البكتيريا مع المبيدات الأخرى. النواحي الخاصة بالميكروبيولوجيا التطبيقية سوف أشير إليها باختصار شديد في هذه المقدمة خاصة أنني تناولت في الأبواب السابقة بعض الاصطلاحات العلمية عن ماهية بكتيريا الباسيلليس والطرز السيرولوجية والعدوى والسمية دون توضيح كافٍ. لذلك كان من حقي والقارئ الكريم أن نتلقى معاني هذه المصطلحات حتى يكون اقتراب إدخال المستحضرات الحيوية بقيادة المايسترو الباسيلليس القديم الحديث المنفرد الأجناس والأنواع والسلالات ذات الأمان النسبي العالي دون إنكار لاحتمالات بعض التأثيرات الضارة في البيئة وعلى مكوناتها بما فيها الإنسان قاهر الطبيعة والمقهور بمثل هذه الكائنات الدقيقة الضعيفة التي تقف شامخة تتحدى كل الصعاب والظروف البيئية المعاكسة شاهدة على قدرة الخالق العظيم الذي خلق كل شيء في أحسن صورة وتقويم واتزان مذهل يجب على الإنسان الظالم لنفسه أن يتدبر كل شيء فيه وحوله خاصة الكائنات الدقيقة.

لقد سبق التنويه بماهية ومكونات النظام البيئي Ecosystem الشامل من أرض وماء وهواء وأحياء دقيقة كانت أم راقية بالإضافة إلي الجماد... لست في حاجة للقول بأن لكل من هذه المكونات دورا يقوم به سخره الله سبحانه وتعالى للقيام به خدمة للإنسان ساكن كوكب الأرض وحامل الأمانة التي أبت الجن والملائكة على حملها خوفا من عظمة الأمانة والمسئولية وتجنبنا للعبث وهوى النفس ومن ثم حملها الإنسان فظلم نفسه ظلما كبيرا بينما حيث أخذ يعبث بها مما أخل بالتوازن بين الخلائق وما استتبع ذلك من مشاكل لا قبل لنا بها خاصة ما يتعلق بالتلوث البيئي بالكيميائيات الصناعية وحتى الطبيعية منها. ما يعنيني في هذا المقام المجال الحيوي "البايوسفير Biosphere" أي نظام الأحياء وكل ما

يوجد على سطح كوكب الأرض يندرج تحت هذا المجال حيث مجتمع الأحياء بالإضافة إلى المكونات غير الحية طبيعية كانت أو كيميائية ... قد يتساءل البعض عن سر وأسباب تنوع الكائنات الحية دقيقة كانت أم راقية والإجابة في غاية البساطة وهي أنه حركية أو ديناميكية النظام البيئي هي السبب. الغوص في بحار الكائنات الدقيقة يوضح سيادتها في النظام البيئي وتداخلها مع الكائنات الأخرى تتأثر بها وتؤثر عليها مما أدى إلى ظهور علم جديد أطلق عليه "علم البيئة الميكروبي" Microbial Ecology والذي يهتم بدراسة الكائنات الدقيقة في الأوساط الطبيعية التي توجد فيها ودراسة العلاقات المتبادلة بينها وبين الأوساط البيئية من هواء وماء وتربة وغذاء وأمراض وغيرها. ليست هذه الدراسات هي التي قادت للكشف عن مجتمع الباسيلليس بأنواعها وأصنافها وأجناسها ومعرفة دورها في مكافحة الآفات الحشرية وتأثيراتها الجانبية الضارة على المكونات البيئية أن وجدت وما تحدثه على الإنسان وهل ترقى إلى أن نطلق عليها مبيد حيوي biopesticide أم لا وهل هي اقتراب جديد أم كانت معروفة منذ سنوات عديدة ... هذا ما سأحاول الإجابة عليه.

توجد الكائنات الدقيقة في الأوساط الطبيعية بأعداد وأنواع متفاوتة ومن النادر أن نتواجد في صورة مزارع نقية حيث عينة التربة مثلا تكون محتوية على بكتريا وخمائر وفيروسات وفطريات وطحالب وبروتوزوا وغيرها في توازن ووثام. ها هي الباسيلليس توجد في التربة بأجناس وأنواع وأصناف وطرز سيولوجية كي تكافح من؟ تكافح الحشرات من الرئس المختلفة خاصة حرشفة الأجنحة. تعيش هذه الكائنات الخليط مع بعضها بالوسط وتتداخل في النشاط بصور مختلفة تتراوح ما بين النشاط أو التضاد. من أكبر المشاكل التي تعترض العاملين في مجال الكائنات الدقيقة العزل والتقية والتعريف. لكل كائن دقيق على غرار الكائنات الراقية ظروف مثلى ينمو ويتكاثر ويؤثر ويتأثر داخلها وحولها. بالطبع تتغير الظروف باستمرار مما يؤثر على تواجد واستمرارية الكائنات الحية بما فيها الدقيقة وقد يؤدي التغير إلى اختفاء كائن ما أو زيادة أعداد ونشاط كائن آخر أو حدوث طفرة في الكائن بحيث تصبح الطفرة قادرة على العيش في الظروف الجديدة والأقرب للواقع أن الكائن الحي يتأقلم مع الظروف الجديدة. السؤال الذي جال في خاطري الآن دون سبب ظاهر يتمثل في التوكسينات التي تنتجها الكائنات الدقيقة مثل الباسيلليس سواء كانت توكسينات خارجية أو داخلية ... هل تنتج في الكائن المستهدف وهو الآفة أو تنتج في المزارع النقية لها ؟ هذا ما سوف أجيب عنه في موضع لاحق ولو أنه واضح التحديد والمعالم في الأبواب السابقة.

لقد تطور علم الميكروبيولوجيا التطبيقية بشكل مذهل في السنوات الأخيرة وأصبح الاسم الشائع المتداول "الميكروبيولوجيا الصناعية" والتي تعنى استخدام الميكروبات تحت ظروف ممكنة لكي تنتج مواد نافعة بمستوى تجارى مثل إنتاج الكيمائيات النقية (أسيٲون - بيوتانول) والمضادات الحيوية (بأنواعها المختلفة) وما تلى ذلك من تعاظم الصناعات التخميرية فى إنتاج الكيمائيات والمواد الحيوية بما فيها المبيدات الحيوية موضوعنا الآن. لقد أصبح معروفا دون أي شك أن الميكروب ما هو إلا مصنع لإنتاج الكيمائيات من خلال سلالات منتخبة أو مهندسة وراثيا من الطحالب أو الفطريات أو الخمائر أو البكتريا. من أهم الأسرار الصناعية فى هذا المجال " نوع وطبيعة وخصائص ومصدر السلالة المنتجة للمواد الحيوية النافعة". من المنتجات الميكروبية المواد والإضافات الغذائية (بروتين، أحماض عضوية وأمينية)، الكحوليات والمشروبات الكحولية (إيثانول - بيرة)، كيمائيات صناعية (أحماض - مذيبات عضوية - أنزيمات) كيمائيات صيدلانية (مضادات حيوية، مركبات استيرويدز، أنسولين ...)، مواد بيولوجية (فاكسينات - مضادات السيرم)، أغراض التحليل والتقديرات الحيوية... الجدول (٣-١) يوضح بعض المنتجات الحيوية الهامة التى تنتج بواسطة البكتريا.

من المعروف وجود علاقات متبادلة بين العائل والميكروب الممرض موصفة ومعروفة بل هى أساس تحديد الأسلوب الأمثل للعلاج. تحدث الأمراض داخل الجسم من خلال التأثير على عمليات التمثيل أو إضعاف جهاز المناعة أو أحداث خلل فى العوامل الوراثية خاصة الشذوذ التركيبى فى الكروموسومات ... الخ. لقد سبق القول بأن مسببات الأمراض الخطيرة مثل السرطان موجودة كامنة داخل الجسم فى سلام وقد أطلق عليها المسببات الأولية للسرطان Procarcinogense وهذه يحدث لها تحفيز من جراء بعض العوامل الخارجية مثل التدخين والانتقال والمبيدات ... الخ والعوامل الداخلية. فى هذا المقام نحن معنيون ليس بالبكتريا نفسها ولكن بالتوكسينات الخارجية والداخلية وهى على جميع المفاهيم والأعراف مواد كيميائية مما دعي الكثير من الباحثين والعلماء الاستفسار عن أمان هذه المبيدات الحيوية التى تتألف من البكتريا بسبب هذه السموم أو التوكسينات. يحدث المرض وتظهر الأعراض نتيجة للعلاقات المتبادلة بين الميكروب الممرض والعائل القابل للإصابة فقد أستقر فى الأعراف أن المرض الناتج من العدوى بالميكروب لا يتحدد من جراء نواحي الميكروب الممرض فقط ولكن بعلاقات مع العائل ومقدرة العائل على مقاومة، فقد تحدث العدوى ولا تظهر أعراض المرض.

فى حالة البكتريا باسيلليس فإنها لكي تعمل كمبيد حيوي قاتل ليرقات حشرية الأجنحة أو غيرها يجب أن تدخل الجسم كما سبق القول وهذه هى العدو بالمعنى الدارج وبعد ذلك تفرز المواد السامة (التوكسينات) حتى تضر بالعائل من خلال التأثير على تركيب الخلية أو وظيفتها أو تفرز أنزيمات تسبب حساسية. تتوقف قدرة الميكروب على أحداث المرض على مقدرة السموم التى يفرزها على قتل العائل المستهدف مكافحته وقتله. قد تفرز السموم خارج الخلية الميكروبية (توكسينات خارجية) أو تبقى داخل الخلية (توكسينات داخلية). السموم الخارجية مواد قابلة للانتشار من داخل الخلية التى تنتجها إلى الوسط الخارجى المحيط بالميكروب ومن ثم يمكن الحصول عليها من المزرعة النامي بها الميكروب. لقد ثبت أن السموم الخارجية عبارة عن مواد بروتينية وزنها الجزيئى مرتفع قد يصل إلى مليون والت ومن ثم يمكن لأنزيمات تحليل البروتين هضمها وهذا هو سبب عدم أحداثها تأثيرات ضارة أو سامة على الجسم إذا أخذت عن طريق الفم مع بعض الاستثناءات. تفقد هذه السموم الخارجية سميتها خلال التخزين الطويل أو تعريضها للحرارة (70°م) أو من جراء المعاملة بالشبة أو الفينولات والأحماض والفورمالدهيد وذلك بسبب تثبيط عمل بعض الأحماض الأمينية الداخلة فى التكوين البروتينى. الهدم أو فقد السمية ينشأ من تحول التوكسين إلى مادة غير سامة تسمى توكسويد toxoid ذات صفات أنتيجينية تحفز الجسم على إنتاج مضادات التوكسين antitoxins التى تقاوم السم الميكروبي المستكون بجسم العائل ومن ثم تقيد فى حماية الأشخاص المعرضين للتسمم. السموم الخارجية ذات تأثير متخصص فمما مايؤثر على الجهاز العصبى neurotoxins (التيئاتوس) أو الجهاز الهضمى Enterotoxin (الكوليرا) أو الخلايا ويسمى سم خلوي cytotoxin (الدفترى) ومنها ما يسبب احمرار الجسم Erythrogenic-toxin (ستربتوكوكس بيوجينز).

السموم الداخلية توجد فى الغالب فى جدار الخلية البكتيرية وهى ذات صفات أنتيجينية ضعيفة وتتكون من مواد معقدة كما سبق القول تحتوى على اليبيدات والسكريات العديدة والبروتين. تحدث هذه التوكسينات فى حالتنا هذه حالات تسمم toxicity وفى حالات أخرى تحدث حالة الحمى Pyrogenicity. لقد ذكر أن حدوث الحمى والسمية ترتبط بالجزء الدهنى - عديد السكريات الداخلى فى تركيب السم بينما تعود الصفات الأنتيجينية إلى الجزء البروتينى فى التوكسين.

الجدول (٣-٢) يوضح الفروق بين السموم الخارجية والداخلية بشكل عام. الجدول مأخوذ من كتاب "الميكروبيولوجيا التطبيقية" من تأليف أساتذتى الكبار أ.د. عبد الوهاب

عبد الحافظ ، أ.د. محمد الصاوي مبارك ومراجعة أ.د. سعد على زكى والصادر من المكتبة الأكاديمية عام ١٩٩٦.

جدول (٣-١): بعض المنتجات الحيوية الهامة المنتجة بواسطة البكتريا

| المنتج | الميكروب | مجالات الاستعمال |
|-----------------------|---|---|
| إنزيم أميليز بكتيري | B. subtilis | تحليل النشا، النسيج، الورق |
| إنزيم بروتيناز بكتيري | B. subtilis | تسوية اللحم، الجلود، الألياف، إزالة البقع |
| إنزيم إستربتو كاينيز | Streptococcus equisimilis | استعمالات طبية لإذابة الجلطة |
| مبيدات حيوية للأفات | B. thuringiensis B. popilliae B. sphaericus | مقاومة يرقات الحشرات، خاصة حشرية الأجنحة، مقاومة البعوض |

جدول (٣-٢): بعض مميزات السموم الميكروبية الخارجية والداخلية

| الصفة | سموم خارجية | سموم داخلية |
|-------------------|--|--|
| الإفراز | خارج الخلية الميكروبية | داخل الخلية الميكروبية |
| المسبب | بكتريا جرام موجب | بكتريا جرام سالب |
| التركيب الكيميائي | بروتين | معقد من ليبو عديد السكريات وبروتين |
| تأثير الحرارة | تأثر بالحرارة وتفقد سميتها عند ٦٠-١٠٠°م لمدة ٣٠ ق | تتحمل الحرارة بما في ذلك الغليان |
| المناعة | يمكن تحويلها إلى توكسويدات. تتعادل مع مضادات التوكسين. | لا تكون توكسويدات. تتعادل صعب مع مضادات التوكسين. |
| التأثير البيولوجي | متخصص شديد التأثير | التأثير العام ، متعدد تكون أغلبها حميات وحساسية عامة |
| الجرعة القاتلة | كميات صغيرة جدا | كميات أكبر، عن تلك الخاصة بالسموم الخارجية |

الشيء بالشيء يذكر حيث أن شدة عدوى بعض الميكروبات المعدية تعود جزئيا إلى ما تفرزه من إنزيمات خارج الخلايا تساعد الميكروب الممرض على الغزو والنفوذ إلى الأنسجة والانتشار بها ومقارنة أجهزة العائل الدفاعية مما يزيد من شدة العدوى. تفرز البكتريا المرضية المذيبة لكرات الدم الحمراء مادة الهيمولايسين التي تذيب كرات الدم الحمراء وينفرد منها الهيموجلوبين من المواد الأخرى التي تفرزها الميكروبات خارج الخلايا ولها علاقة بزيادة شدة العدوى الأمونيا وفوق أكسيد الأيدروجين (الميكوبلازما) وغيرها.

جدول (٣-٣): بعض الإنزيمات الخارجية، التي تفرزها الميكروبات، ولها علاقة بالعدوى

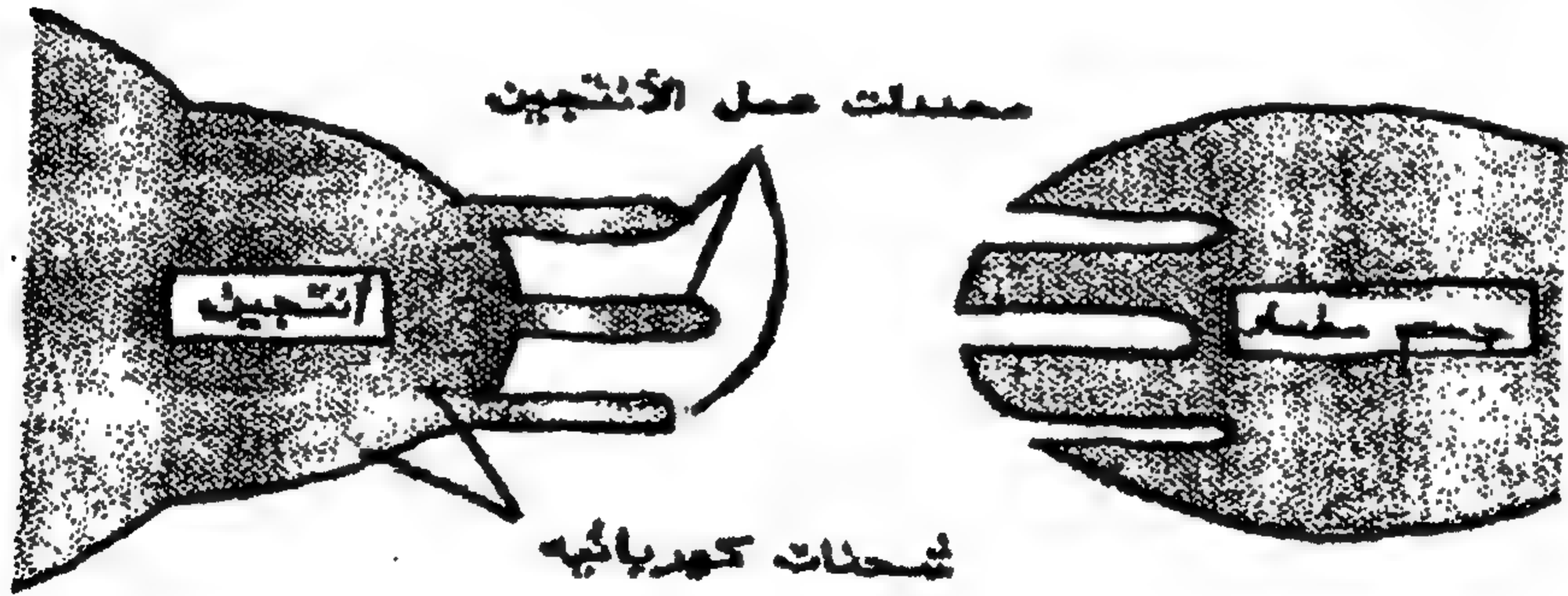
| الإنزيم | أمثلة من البكتيريا المنتجة | التأثير |
|---------------|------------------------------|--|
| Coagulase | Staph. Aureus | يشارك في تجلط البلازما |
| Collagenase | CI. perfringens | يحلل الكولاجين، وهيلياف العظام وبالنسيج العظمي |
| Hemolysin | Staph., Streph., Clostridium | يذيب كرات الدم الحمراء |
| Hyaluronidase | Staph. aureus, Clostridium | يحلل حامض الهيالورونيك، الرابط للأنسجة |
| Lecithinase | CI. perfringens | يحلل كرات الدم الحمراء، وكثير من خلايا الأنسجة |
| Leucocidin | Staph. aureus, Streptococcus | يقتل كرات الدم البيضاء |
| Streptokinase | Streptococcus | يذيب فيبرين الدم المتجلط، فيسببه فيساعد بذلك على انتشار الميكروب |

قد يحتوي النوع البكتيري على سلالات مختلفة بعضها قادر على أذابه كرات الدم الحمراء وهي تتميز بشدة عدواها بالمقارنة بالسلالات التي لا تذيب كرات الدم الحمراء. بعض أنواع البكتيريا المرضية تملك تركيبات خلوية لها علاقة بزيادة شدة العدوى مثل الكبسولات والشعيرات. إذا فقدت هذه التراكيب أو حدثت من خلال الطفرية تضعف قدرتها وشدة العدوى مثل بكتيريا التهاب الرئوي. بعض الميكروبات لها مقدرة على إصابة موضع معين خلايا كانت أو أنسجة أو طور معين أو مستقبل معين. إذا تكلمنا عن منافذ الدخول نقول أن المصادر الأساسية لعدوى الإنسان والحيوان هي المرضى وحامل الميكروب والستربة. منافذ الدخول متعددة تشمل الجلد والمسالك التنفسية والقناة الهضمية والمسالك البولية التناسلية ومفصليات الأرجل.

طرق الانتقال والانتشار للميكروبات المرضية متعددة وهي تشمل الهواء أو الأغذية والفياض أو باللمس المباشر أو بواسطة مفصليات الأرجل وهناك ميكروبات تنقل عن طريق الجروح والحقن والدم كما في أمراض التهاب الكبد والإيدز. وعندما ينتشر المرض المعدي بين عدد كبير من الأفراد قد يسبب حالة وباء Epidemic وهذا ما دفعني لتناول حدوث وبائيات من جراء التعرض المستمر على المدى الطويل للكيميائيات والملوثات حيث نظرت إليها من زاوية الأمراض المعدية ومسبباتها.

لقد ذكر في مواضع كثيرة أنتيجينات Antigen ويطلق عليها المستضدات وهي أي مادة التي عند دخولها الجسم تؤدي إلى حدوث مناعة مكتسبة وذلك بتكوين أجسام مضادة تدور مع الدم أو تؤدي إلى زيادة عدد الخلايا الليمفاوية وكلاهما تتحد مع الجسم.

المضاد بشكل متخصص. لكي يكون للمادة خواصا أنتيجينية يجب أن تكون مادة غريبة عن الجسم ذات وزن جزيئي مرتفع (أكثر من ١٠ آلاف دالتون) قابلة للذوبان في بلازما الدم. بعض الأنتيجينات سكريات معقدة والغالبية العظمى بروتينات. هناك بروتينات ليست أنتيجينية مثل الجيلاتين بسبب غياب بعض الأحماض الأمينية. هناك بعض المواد غير أنتيجينية ولكنها بعد اتحادها مع البروتين تصبح قادرة على تكوين الأجسام المضادة (أنتيجينية) وتسمى الهابتين أو Haptens مولدات مضاد غير كاملة وهذه توجد في عدد كبير من البكتريا. لكي تحدث المناعة المكتسبة لابد من اتحاد الأنتيجين والجسم المضاد كما سبق القول. لكي يعمل الأنتيجين لابد أن تتوفر محددات هذه العمل وهي مراكز التفاعل ذات وزن جزيئي منخفض حوالي ألف والتون وقد يصل عدد المحددات الى ألف أو أكثر وفي بعض الأحيان لا يزيد ٢ أو ٣. والمحددات هي التي تحدد تخصص الأنتيجين بسبب طبيعة التركيب والشحنات الكهربائية ومدى تطابق سطوح كل من الأنتيجين والجسم المضاد (شكل ١-٣)

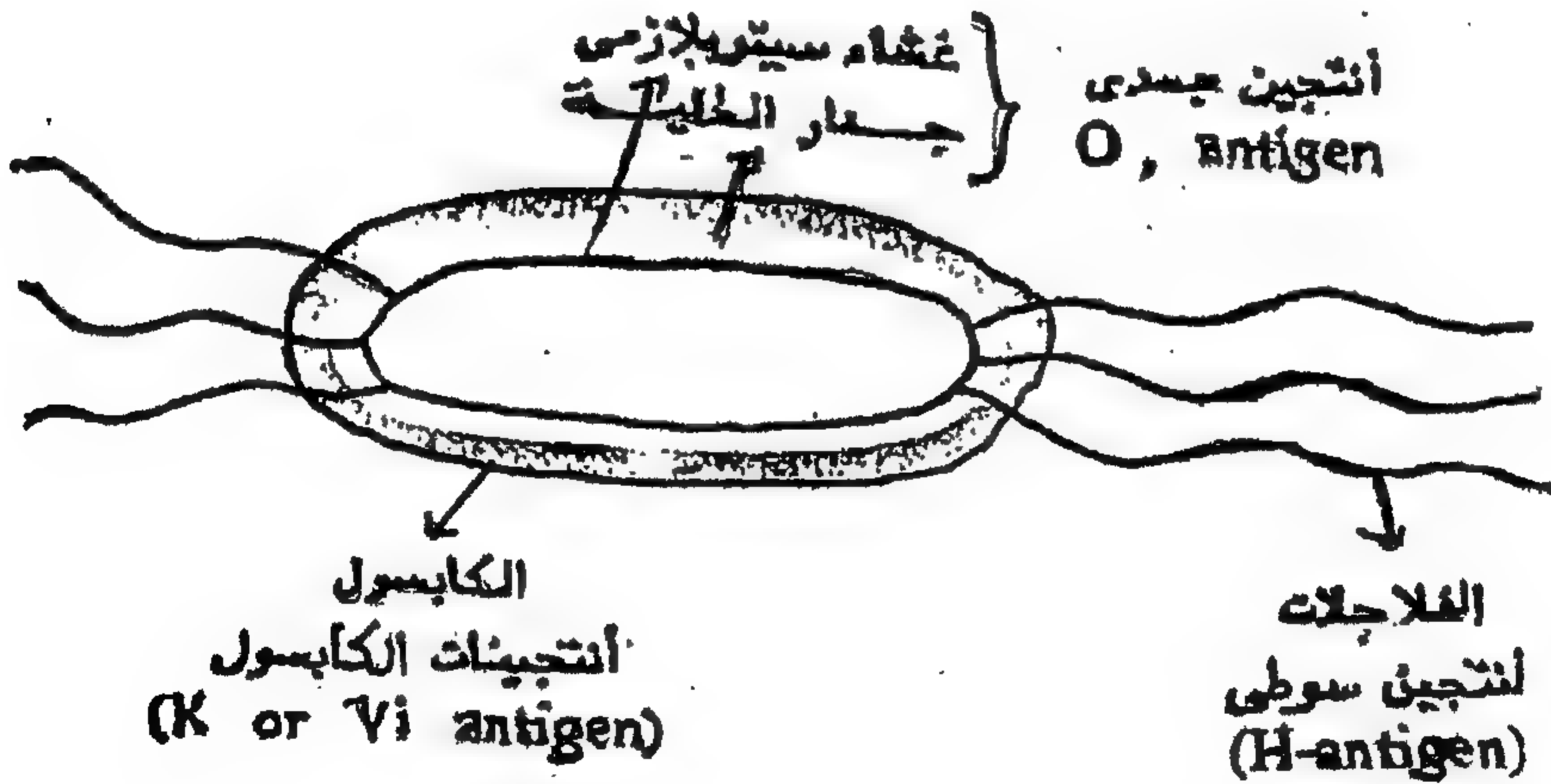


شكل (١-٣): رسم تخطيطي يوضح مراكز التفاعل بين الأنتيجين والجسم المضاد.

هناك المواد المساعدة التي عندما تحقن بالجسم مع الأنتيجين تساعد في زيادة إنتاجه من الأجسام المضادة مثل الشبه وأملاح الألومنيوم والجيلات الصوديوم وكذلك التوكسينات الداخلية للبكتريا. توجد أنتيجينات طبيعية ذات أهمية طبية ومنها ما يوجد في أنسجة جسم الإنسان وكرات الدم الحمراء مجاميع الدم والتوافق منه النسيجي ثم الأنتيجينات البكتيرية والفيروسية والبكتيرية متعددة إما أن تفرز خارج خلية البكتريا كإنزيمات أو توكسينات خارجية أو توجد بداخلها مكونة لأحد مكوناتها الداخلة في تركيبها الخلوي (شكل ٢-٣).

لقد ذكرت الطرز السيرولوجية لبكتريا الباسيلليس في أكثر من موضع لذلك رأيت أن أحدد المقصود بالسيرولوجي والسيرولوجية والتشخيص السيرولوجيه من المعروف أنه لا يمكن رؤية الأجسام المضادة بالعين المجردة ولكن يمكن التعرف عليها من التفاعلات التي تتم بينها وبين الأنثجين الذي أنتجها. تجرى هذه الاختبارات في المعمل وتسمى اختبارات سيرولوجية وهي أفضل دليل عن وجود أو عدم وجود أجسام مضادة بسيرم الدم. من هذه الاختبارات التجمع والترسيب وتحلل الخلايا وتفاعلات المكملات وتسهيل الألتقام ومعادلة السموم الميكروبية ومعادلة الفيروسات. في الوقت الراهن تستخدم الاختبارات السيرولوجية بكثرة لأغراض متعددة مثل التعريف السيرولوجي للميكروبات ودراسة تكويناتها الأنثجينية والتعرف عليها وقياس الاستجابات المناعية والتشخيص السيرولوجي المعملية للأمراض المعدية وفي الدراسات الخاصة بالدم وقد تطورت هذه الاختبارات كثيرا باستخدام النظائر المشعة والأنزيمات والصبغات الكلورينية (مأخوذة من كتاب الميكروبيولوجيا التطبيقية الصادر عن المكتبة الأكاديمية، ١٩٩٦ جمهورية مصر العربية).

الميكروبيولوجيا التطبيقية



شكل ٣-٢: الأنثجينات الداخلة بتركيب بكتريا سالبة لصبغة جرام مثل السالمونيلا.

الفصل الأول

ثبات ونشاط مستحضرات الباسيلليس Bt في البيئة

تراكم وثبات الباسيلليس Bt والتوكسينات التي تنتجها قد تؤدي إلى حدوث أضرار بيئية كما هو الحال مع التعرض الزائد للأنواع غير المستهدفة وانتخاب أنواع الآفات المقاومة للتوكسين. مآل ومصير Bt في البيئات الخارجية معروف فقط في حدود المعرفة الخاصة بالنواحي العامة مثل: التوكسينات عادة تفقد فعاليتها خلال أيام في منطقة المجموع الخضري والتربة بينما الجراثيم الداخلية تستطيع البقاء في التربة لفترات طويلة من شهور وحتى سنوات. تستطيع البكتريا التضاعف بشكل كبير في الأماكن المناسبة لمعيشة الكائنات الدقيقة ومن بينها اليرقات المستهدفة. حيث أن الأمراض الحيوانية الطبيعية لا يمكن أن تحدث في الخارج outdoors على عكس مخازن السلع الاستوائية فإن يصعب فهم كيفية موثمة البكتريا Bt وصيانة معيشتها في البيئة الخارجية. من الاحتمالات الممكنة حدوث النمو والتجثم خارج الحشرة العائل كما في التربة الغنية بالمغذيات، توازن الأدلة أدى إلى الاقتراح بأن مجاميع Bt في التربة المدعمة صناعيا يحدث لها خفض متفاوت إلى مستويات غير ضارة. استمرار بقاء الباسيلليس Bt على المادة النباتية وفي الماء يجب أن يؤخذ في الاعتبار عند تقييم خطر السمية على الكائنات غير المستهدفة. في الماء تعاني Bt من نقص الثبات مع قليل من النشاط يستمر لأيام قليلة بعد المعاملة. معدل اختيار مختلف منتجات Bt يتأثر بالعديد من العوامل منها نوع المستحضر وطريقة ومعدلات التطبيق والوسط الذي تستخدم فيه. العوامل البيئية مثل التعرض للأشعة البنفسجية تؤثر كذلك على الثبات. السؤال الذي يطرح دائما مع المبيدات كان عن مدى الثبات ولأي فترة يستحب أن يظل المبيد ثابتا في البيئة وما قد يستتبع ذلك من تأثيرات مطلوبة أو غير مرغوبة.

الثبات في التربة Persistence in soil:

البقاء على صورة جراثيم: جراثيم الباسيلليس Bt تستطيع البقاء لفترات طويلة في البيئة المحمية نسبيا للتربة. لقد تم تقدير نصف فترات الحياة تجريبيا ووجد أنها تتراوح في العادة بين ١٠٠-٢٠٠ يوم (هانسن وآخرون ، ١٩٩٦). في أحد التجارب الحقلية في يوتا

بأمريكا ظلت جراثيم Bt التي سبق استخدامها لمكافحة الفراشة العجورية في الغابات دون أن تتضاعف ولكنها بقيت حية لمدة ٢٤ شهر تقريبا (سميث وباري، ١٩٩٨). لم يحدث فقدا في حيوية الديبيل ١٧٦ (باسيليس كروستاكي) في الأراضي الحامضة على امتداد ٨ أسابيع عندما استخدمت بالمعدل الحقل الموصى به (يكافئ ١٨ لتر/هكتار) (visser، وآخرون ١٩٩٤). لقد درس بيدرسين وآخرون (١٩٩٥) حركية مجموع الباسيليس كورستاكي في حقول الكرنب ووجد أن نصف فترة الحياة زادت عن ١٠٠ يوم في الطبقة العليا من الأرض.

أنبات الجراثيم والنمو في التربة: بينما سجل نمو خضري في الأراضي المعقمة مرات عديدة إلا أنه في وجود كائنات دقيقة أخرى تتجرثم Bt بدلا من النمو الخضري (yara، وآخرون ١٩٧٧). لقد قام الباحثان بتيراس وكاسيدا، (١٩٨٥) بتحصين Bt المتاحة تجاريا في التربة الطبيعية ووجدوا نقص يقارب ١ لوغاريتم في الأسبوعين الأولين ولكن كانت أعداد الجراثيم ثابتة نسبيا على امتداد ثمانية أشهر. إذا أضيفت الخلايا الخضرية للتربة فإن هذه الخلايا تستمر في البقاء والمعيشة لمدة ١-٢ يوم فقط (بتيراس وكاسيدا، ١٩٨٥، أكيبا ١٩٨٦-١). لقد خلص العديد من الباحثين إلى أن استمرار المعيشة في التربة يرجع إلى نقص أنبات الجراثيم (West وآخرون، ١٩٨٥). بالنسبة للباسيليس Bt فإن توفر الغذاء يبدو أنه العامل الأكبر المحدد للنمو في التربة. بينما لا تستطيع Bt أن تنمو تحت ظروف التربة فإن من بعض الحالات يبدو أن Bt تثبت وتنمو في التربة ولو أن الدليل على هذا الحدوث محدود. لقد أظهر صالح وآخرون، (١٩٦٩). أن الجراثيم نبتت ونمت وتجرثمت في الأراضي ذات المجموعة المتعائلة والتي عدلت مع البرسيم أو الكازين. في دراسة أخرى لم تعيش الخلايا الخضرية في الأراضي الحامضة. جراثيم Bt كانت قادرة على الإنبات في الأراضي المعقمة وليس في الأراضي غير المعقمة (Akiba) ، (١٩٨٦-١). لقد حدث النمو في الأرض المعقمة مع حموضة ٥، ٥ - ١، ٧ ولكن ليس مع حموضة أكل من ٤، ٥ (Akiba، ١٩٨٠). على نفس المنوال وجد West وآخرون، (١٩٨٥) حدوث خفض في النمو عند درجة حموضة ٢، ٥ بالمقارنة بحموضة ٣، ٧. لقد أوضح West and Burges، (١٩٨٥) أن تعديل التربة بمواد عضوية مختلفة أثر على نمو ومعيشة الباسيليس. التربة التي أضيف إليها النجيل الجاف حدث بها زيادة ٢٢ مرة

فى خلايا Bt فى التربة على امتداد ما يزيد عن ٦٤ يوم بينما أدى سماء مخلفات الفراخ الى خفض حيوية Bt الى ٠,٢٢ مرة عن المستوى الاصلى.

ثبات فعالية ونشاط توكسين الباسيلليس Bt: أن المعلومات المتوفرة عن مصير أو مآل التوكسينات الناتجة من تحت أنواع الباسيلليس Bt فى التربة محدودة وهى تشير فى مجملها الى الاختلاف العريض والكبير فى ثبات توكسين Bt فى البيئة. لقد فتح ذلك مجال جديد فى البحث والدراسات فى اتجاه الكائنات المهندسة وراثيا التى تعبر عن توكسينات Bt. هناك بعض الأدلة تفيد بأن ارتباط توكسينات Bt بالأحماض الدبالية والمضافات العضوية أو على جسيمات التربة تحمى التوكسينات من الأنهيار بالميكروبات دون أن تؤثر على نشاطها الأبادى ضد الحشرات (West, ١٩٨٤, Koskella and stotzloy, ١٩٩٧). لقد وجد أن التوكسينات من الباسيلليس كورستاكى والتينيريونيس تدمص بسرعة وترتبط بشدة على معادن الطين والمونتمورولينيت والكاؤولينيت وعلى عناصر الطين المفصولة من التربة (Tapp and stotzky, ١٩٩٥) وعلى الأحماض الدبالية المستخلصة من التربة. لقد تم الاحتفاظ بالنشاط الإبادى على الحشرات عندما تم تحضين توكسينات الباسيلليس كورستاكى فى التربة ولكن كمية الارتباط اختلفت مع نوع التربة. لقد ظلت التوكسينات التى أضيفت للتربة المعدلة بالكاؤولينيت سامة على يرقات "ماندوكاسيكستا" لمدة تزيد عن ستة شهور بينما نفس التربة المعدلة بالمونتمورولينيت أظهرت خفض فى الفاعلية ضد الحشرات بعد ٣٥ يوم فقط. لقد كانت درجة حموضة الأراضى التى حدث فيها خفض فى الفاعلية ضد الحشرات عالية (٨, ٥ - ٣, ٧) عن الأراضى التى ظلت الفاعلية الأبادية ضد الحشرات كما هى (٩, ٤ - ١, ٥). حيث أن النشاط الميكروبي فى درجات الحموضة العالية كان عالياً فإن الميكروبات فى التربة ذات الحموضة العالية قد تهدم كميات من التوكسينات أكثر. لقد أشار تاب وستوتزكس، (١٩٩٨) الى وجود احتمالات لتراكم توكسينات Bt فى الأرض والاحتفاظ بفاعليتها ضد الحشرات خاصة عندما ترتبط على معادن الطين أو الجسيمات خاصة فى الأراضى ذات درجات الحموضة المنخفضة.

لقد أشارت الدراسات الأولى الى مدى من تقديرات ثبات فاعلية التوكسين بالرغم من عدم القيام بالتمييز بين التوكسينات والجراثيم. لقد درس Pruett وآخرون ، (١٩٨٠)

ثبات جراثيم الباسيلليس جاليريا والتوكسينات في المعمل تحت نظام بيئي مصغر "ميكروكوزم" على درجة ٢٥°م. لقد انخفضت حيوية الجراثيم على امتداد ١٣٥ يوم حيث نقصت بمقدار ٢٤% من الأعداد الأصلية بينما نقصت السمية على دودة الشمع الى أقل من ١%. لقد أدى ذلك الى الاقتراح بحدوث انهيار سريع في التوكسين النقي عما هو الحال مع الجراثيم وقد تأكد ذلك بواسطة West وآخرون ، ١٩٨٤. النشاط الباقي الفعال للتوكسينات من Bt اليابانية (كما قيست بواسطة التقييم الحيوي من يرقات أنومالا كوبريا) كان طويلا وممتدا من الأراضي من حقول البطاطا وأماكن نجيل الزينة حتى ٤٠ يوما (سوزوكي وآخرون ، ١٩٩٤). في دراسة على الباسيلليس كورستاكي و Bt تينبيريونيس في التربة الطينية دام النشاط الأبدى ضد الحشرات لأكثر من ٤٠ يوم في الأرض غير المعقمة. لقد وجد وسيت وبيرجيز ، (١٩٨٥) أن النشاط الأبدى ضد الحشرات للباسيلليس على صورة بلورات الجراثيم الخارجية نقص بشكل أسى في أرض النجيل وتلك المضاف لها السماد البلدي مع نصف فترة حياة حوالي ٥ ، ٩ ، ٥ ، ٨ أيام على التوالي. تجدر التذكيرة بأنه في معظم التجارب فإن جراثيم وبلورات Bt كانت تضاف في البداية الى التربة بتركيزات أعلى كثيرا من تلك المطلوبة لمكافحة اليرقات في الفيلوسفير حتى يمكن قياس الانهيار مع الوقت. في الحقل فإن Bt التي تستهدف الفيلوسفير سوف تصل الى التربة وتصبح مخففة جيدا تحت المستويات التي تحدث إبادة للحشرات. الانهيار في التربة قد يزيد من المعدل المطلوب من تكرار رش المجموع الخضري ولذلك فإن مجاميع Bt التي تصل الى التربة سوف تنهار مع الوقت الى المستوى الطبيعي المتذبذب.

استمرار سمية الدلتا - أندوتوكسينات الفردية للباسيلليس Bt في النباتات سجلت مع بروثين Cry 2A في القطن مع نصف فترة تثبيط النمو ضد دودة اللوز الأمريكية حوالي ١٥-٣٠ يوم (Sims and Ream ، ١٩٩٧). لقد وجد Palm وآخرون ، (١٩٩٦) توكسين منقى للباسيلليس كورستاكي أو توكسين مكبس في أوراق القطن المعدلة وراثيا في التربة بعد ١٤٠ يوم.

الثبات على المجموع الخضري Persistence on foliage

البقاء والمعيشة كجراثيم: نصف فترة حياة جراثيم Bt في منطقة الفيلوسفير وجدت أقصر كثيرا عما هو الحال في التربة. لقد أثار هانسن وآخرون ، (١٩٩٦) أن نصف فترة

الحياة المقدرة كانت فسي مدى أقل من ١-٣ أيام وقد أيدت هذه التقديرات من خلال الدراسات الحقلية. لقد وجد الباحث بيدرسون وآخرون، (١٩٩٥) أن نصف فترة الحياة الابتدائية (في الأسبوع الأول) كانت ١٦ ساعة مع الباسيلليس كورستاكي التي عوملت على أوراق الكرنب مع نقص بمقدار ٥ وحدات خلال الأسابيع الأربعة الأولى بعد الرش. على نفس المنوال استخدمت جراثيم Foray UB على ابر نبات الصنوبر في ليتونيا وقد وجد حدوث نقص في أعدادها في اليومين الأولين ووصلت نسبة الموت في البكتريا ٦٨% بعد يومان على الصنوبر وزادت الى ٨٨% في اليوم الخامس. لقد وجد موريس ١٩٧٧-أ أنه عند استخدام الديبيل 36B على الصنوبر الأبيض وشجرة البلسم ووجد أن نصف فترة الحياة للجراثيم على القطن اختلفت من ٧٥-٢٥٦ ساعة اعتمادا على المستحضر (سلامه وآخرون، ١٩٨٣-ج). لقد قام سميث وباري (١٩٩٨) بدراسة ثبات الباسيلليس كورستاكي بعد المعاملة في يوتا (٧٢ بليون وحدة دولية لكل أكر لكل سنة على امتداد خمسة سنوات) بغرض استئصال الفراشة الفجرية. لقد وجد الباحثان أنه بينما تثبت الجراثيم في التربة حتى سنتان إلا أنه لم يكن هناك اختلاف بين أعداد جراثيم Bt على الأوراق المرشوشة وغير المرشوشة التي أخذت عيناتها بعد ١٢ شهر من المعاملة. لقد وجد مدى واسع من الطرز الوراثية من Bt بما فيها السلالة التي استخدمت على الأوراق.

إن كيمياء سطح الورقة (درجة حموضة مرتفعة أو وجود أنزيمات البروتيناز والاليلوكيميائيات) قد تؤدي إلى انهيار البروتين البللوري. التركيب الدقيق والبيئات الدقيقة الطبيعية والكيميائيات لسطوح الورقة تختلف بشكل عريض بين أنواع النباتات (بيرجز وجوتز، ١٩٩٨). لذلك فإن الاختلاف في ثبات Bt على الأنواع النباتية المختلفة غير متوقع. لقد وجد الباحث بينوك وآخرون، (١٩٧٥) أن معدلات الاستقرار الابتدائية وما يستتبع ذلك من ضياع حيوية الجراثيم تختلف بشكل مؤكد بين أربعة أنواع من الأشجار. أوضحت العديد من الدراسات التي أجريت على أوراق الصنوبر أن امتداد معيشة Bt لمدة أطول عما لو كانت على أوراق الأشجار. عندما استخدمت الباسيلليس كورستاكي (Foray 48B) على الصنوبر لمكافحة الفراشة الفجرية في بولندا وجد أن الجراثيم تم الكشف عنها بعد ١٢١ يوم بعد المعاملة (Damgaard وآخرون، ١٩٩٦-b) بتركيزات أعلى من التركيز المعروف على الصنوبر قبل المعاملة. أظهر التحليل الحيوي باستخدام

L.monacha اختفاء الفعل الأبادى على الحشرات على أوراق الصنوبر بعد ٢١ يوم من الرش بالرغم من استمرار تواجد الجراثيم.

وضع Bt على الأوراق يؤثر كذلك على الثبات. لقد تحلل الثوروسيد HPC ببطئ كبير على الأسطح الخلفية للشوفان مقارنة بالأسطح العليا. لقد سجل دوام طويل للمعيشة بشكل عرضي كما في استرجاع الجراثيم الداخلية الحية من أوراق الصنوبر التي جمعت بعد سنة من المعاملة.

ثبات نشاط توكسينات الباسيلليس Bt: ثبات الفعل الأبادى ضد يرقات الحشرات مع الجرعات الموصى بها درس جيدا حيث أن دوام فعالية البلورات تتأثر تماما بواسطة الأشعة فوق البنفسجية في ضوء الشمس بدرجة أفضل مما هو الحال مع الجراثيم، فإن النشاط الأبادى المسجل ضد اليرقات يعكس نشاط البلورات لأن أعداد الجراثيم الحية يمكن أن تقل بصورة واضحة دون أن تنخفض الفعالية ضد معظم الحشرات في منطقة الفيلوسفير. فإن نصف فترة حياة التوكسينات تكون قصيرة لأقل من واحد يوم (هانسن وآخرون ، ١٩٩٦) وقد أظهرت العديد من الدراسات الحقلية نشاط باقي قمير على المجموع الخضري بينما أظهرت دراسات أخرى استمرار دوام معيشة Bt لمدة أطول. من الواضح أنه توجد أسباب عديدة تؤثر على ثبات نشاط التوكسينات. لقد استخدمت هذه الدراسات مستحضرات مختلفة محسنة بهدف زيادة استمرار المعيشة والثبات بشكل أفضل كما ذكر سابقا فإن الوسط يؤثر بشكل مباشر على المعيشة والدوام.

الثبات على الأشجار: لقد وجد الباحثان فرانكينهوزن ونستروم ، (١٩٨٩) أن المستحضر المائي عالي الفاعلية للباسيلليس Bt (ثوروسيد 48 LV) أظهر سمية ذات أثر باقى على C. Fumiferana لأقل من يومان على الصنوبر (المجموع الخضري). أظهرت دراسات أخرى أن النشاط الأبادى للحشرات يمكن أن يمتد على الأوراق لفترات أطول. في تطبيق ميداني أجرى في أمريكا لمكافحة الفراشة الفجرية أظهر رش Bt دوام الفعالية لمدة ٦٤ يوم على الأقل. لقد تم الكشف عن توكسينات Bt (من الثوروسيد 16B والديبيل 4L) على الأوراق بعد ١٦ يوم من المعاملة واستمرت قادرة على قتل الآفة. لقد استمرت

مستحضرات الديبيل 8L و Forny 48B فعالة لمدة ٦-٨ أيام على التوالي ضد حشرة
T.Pity ocampa .

على المحاصيل الحقلية: لقد تم تقدير دوام الحيوية والفعل الأبادى ضد الحشرات لبكتريا
الباسيلليس على عدد من المحاصيل الحقلية. فى الغالب قدرت نصف فترة الحياة فى النشاط
الأبادى ضد الحشرات بأنها أقل من ٢٤ ساعة. لقد وجد Ignoffo وآخرون ، (١٩٧٤)
فقد ٦٥% من الفعل الأبادى ونقص ٩٠% من حيوية الجراثيم على أوراق فول الصويا فى
اليوم الأول من المعاملة ولو أن بعض النشاط الأبادى استمر حتى اليوم السابع بعد
المعاملة. على المجموع الخضري للطماطم واستمرت سمية Bt على دودة اللوز الأمريكية
لأقل من ٤٨ ساعة بينما نقصت نسبة الموت بسبب Bt تيفيريونيس (M-one) من ٨٥%
على الطور الأول من حشرة L.decemlineata بعد ساعة من المعاملة إلى أقل من ٥%
موت بعد ٤٨ ساعة (Ferro وآخرون ، ١٩٩٣). على نفس المنوال أحدث مستحضر M-
Trak لنفس البكتريا ٩٠% موت على نفس الحشرة بعد ساعة من المعاملة فى مقابل ٢٠
% موت بعد ٧٢ ساعة. الدلتا - اندوتوكسين من Bt كورستاكى عندما عوملت بالرش
الجوى والأرضى فى مزارع البيكان دامت فعالة لفترة قصيرة (Sundaram وآخرون،
١٩٩٧). لقد كان ثبات Bt أقل من أربعة أيام فى منطقة الفيلوسفير فى التوت والفاصوليا
والفول السودانى والطماطم والأرز. لقد استمر نشاط وفاعلية الثوروسيد HP ضد الثاقبات
حتى ١٠ أيام من المعاملة. لقد كشف حامد وجود جراثيم بكتيرية حية من الديبيل بعد ١٠،
١٨ يوم بعد المعاملة وسجلت نسبة موت ١٠٠% على يرقات العمر الثالث لحشرة
Yponomeuta بعد ١٢ يوم من المعاملة بالديبيل والثوروسيد.

الحبوب المخزونة: من الشائع استخدام Bt ضد آفات الحبوب المخزونة. الحبوب
المخزونة تمثل بيئة محمية ومن ثم يتحسن وضع ثبات نشاط وفعالية Bt مقارنة بالوضع
على المحاصيل. عندما عوملت حبوب القمح بالديبيل لم يحدث نقص ملحوظ فى الفاعلية
ضد حشرة البلوديا على امتداد سنة فى شونة المزرعة تحت ظروف حرارة متذبذبة
(كيسنجر وماجهاوى، ١٩٧٦). لقد ظل الثوروسيد (باسيلليس كورستاكى) فعال ضد
البلوديا على الشوفان لأكثر من خمسة شهور على درجات حرارة ١٢-٢٨°م ورطوبة

نسبية ٧٥% (شميدت، ١٩٧٩). لقد حققت الباسيلليس تورستاكي حماية لدرنات البطاطس ضد هجوم فراشة درنات البطاطس القوثريميا عندما استخدمت داخل المخازن لفترات أطول من ٢٥٥ يوم (سلامة وآخرون، ١٩٩٥-ط). لقد أثار سلامة وآخرون (١٩٩٦-أ) الدلتا - أندوتوكسين والبيتاكو توكسين للباسيلليس كورستاكي تناقصت فعاليتها ضد يرقات البلوديا على الحبوب المخزونة ببطي مع امتداد ١٥٠ يوم بينما التوكسين الخارجي بيثيا نقص للجرعة أكبر:

ثبات الباسيلليس في الماء : لقد أشارت معظم التقارير عن ثبات Bt في الماء الي الفعل الأبادي ضد يرقات البعوض وتحت الأنواع السامة للذباب الأسود مثل Bt الإسرائيلية ولو أن بعض الدراسات تناولت مآل ومصير الباسيلليس كورستاكي في الماء. بعد الرش الجوي للباسيلليس كورستاكي (توروسيد 16B) لمكافحة حشرة C. Fumiferana في غابات كندا الشرقية إلى الكشف عن البكتيريا من الأنهار حتى ١٣ يوم بعد الرش مع فرضية استمرار التسرب في الماء. أظهرت الدراسات العملية أن جراثيم Bt كورستاكي تستطيع الاستمرار في المعيشة في المياه العذبة وماء البحر لأكثر من ٧٠، ٤٠ يوم على التوالي على ٢٠°م. لقد أشار Buckner (١٩٧٤) إلى مستويات حوالي ١٧٣٠ جرثومة/مليلتر في مياه النهر بعد معاملة Bt ولم يتم الكشف عن الجراثيم في النهر بعد شهر لاحقا. الباسيلليس الإسرائيلية تعاني من نقص الثبات في الماء عند مقارنته بوسائل مكافحة البعوض (مثل ميثوبرين ، تيميفوس). في الماء وجد أن سمية هذه البكتيريا تستمر في أماكن معيشة وتغذية اليرقات لأيام وليست أسابيع. المستحضرات الأولى من الباسيلليس الإسرائيلية لم يكن لها أثر باقي فعال ضد يرقات البعوض لأقل من يوم من المعاملة ولو أن الدلتا - أندوتوكسين تظل ثابتة كيميائيا في المياه المتعادلة والحامضة (Sinagre وآخرون، ١٩٨١-أ). الترسيب قد ينقص من ثبات الباسيلليس الإسرائيلية. لقد وجد شيران وفيشر، (١٩٩٢). أن التقليب هو من أكثر العوامل الهامة في صيانة الثبات لهذه البكتيريا على صورة خلايا وكذلك التيسر الحيوي لتوكسين الباسيلليس أسرنيلينسيز. في هذه الدراسة إتضح أن الترسيب ينقص الفاعلية ضد يرقات العمر الثالث للأبيدس إيجيبتي عن طريق زيادة استقرار الجسيمات السامة ولكنها لم تنقص الثبات لجراثيم الباسيلليس الإسرائيلية نفسها.

فى معظم الدراسات اختفت فاعلية الباسيلليس الإسرائيلية خلال ١-٤ أسابيع (Mulla وآخرون، ١٩٨٥....). أظهرت تجارب الميكروكوزم المعملية فى فرنسا على العمر البرقى الرابع لبعوض الأيديدس إيجيتى أن المعلقات المجهزة من مستحضري Bt إسرائيليسيز امتدت فاعليتها بترك اليرقات الميتة فى الماء وقد أصبحت كضحية أو فرائس للافتراس (Larget، ١٩٨١). على العكس فإن مستحضر هذه البكتريا أكروب حقق مكافحة فعالة على امتداد ٤٧ يوم فى فلوريدا فى الأماكن التى تتراكم فيها اليرقات الميتة (بيكل وآخرون، ١٩٩٦). الدراسات على نمو الباسيلليس Bt. خارج الحشرة أظهرت قليل أو عدم التكاث حيث من النادر أن تنتشر Bt من نقطة العدوى على الأرض ولو أن الكائنات غير المستهدفة مثل السمك (Snarski، ١٩٩٠) تقوم بنشر Bt إسرائيليسيز فى الماء. الافتقار إلى التدوير للباسيلليس فى مجاميع الحشرات أو نقص النمو فى الماء تقلل من الثبات. أن وجود الكلورين الحر فى الماء قد يثبط أو يحطم الأندوتوكسين وقد تأكدت علاقة عكسية واضحة بين كمية الكلورين فى الماء وجدت اليرقات بسبب الباسيلليس إسرائيليسيز. لقد وجد أن تركيزات الكلورين فى محاليل الباسيلليس بين صفر - ١٠٠ جزء فى المليون ذات تأثير قليل على الفاعلية. لقد وجد أن كمية بقايا الكلورين التى تستخدم فى العادة لتنقية الماء لا تعتبر كافية لتحطيم جراثيم الباسيلليس كورستاكى. أن عزل جراثيم Bt من نظام أو شبكة توزيع المياه أثار تساؤلات عن تأثير عملية إضافة الكلور فى إعاقلة تنشيط الباسيلليس كورستاكى فى نظام تنقية المياه. لقد وجد أن بقايا الكلورين الكلى فى حدود ٥، ١ ملجم/لتر على الأقل مع فترة تلامس ٦٠ دقيقة مطلوبة لإيقاف نشاط ٩٩% من Bt كورستاكى فى مياه الصنبور على درجة حموضة ٢، ٧ مع ٢٠ جم (مينون وماسترال، ١٩٨٥).

العوامل التى تؤثر على الثبات:

العوامل الحيوية Biotic factors: لقد نشر وأقترح العديد من الباحثين عن الانهيار الميكروبي للباسيلليس Bt كما أتضح من مقارنة الاختلاف فى نمو ودوام معيشة Bt فى الأراضي المعقمة فى مقابل الأراضي العادية (West وآخرون، ١٩٨١، أكيبا، ١٩٨٦-١). هذا بينما لم يجد هاس وسكريير (١٩٩٨) فرق فى دوام معيشة الباسيلليس كورستاكى على الأوراق التى أزيل لونها (التبييض بالكلوروكس ٥%) والأوراق الغير مبيضة

المعاملة. قبل المعاملة بالتبييض صممت لإزالة المستعمرات الميكروبية من الأوراق. لقد وجد شيران وفيشر (١٩٩٢) أن التأثيرات التنافسية من الكائنات الدقيقة الأخرى لم تؤثر على ثبات بكتريا الباسيلليس أسرائيلينسيس في الماء ولكن توكسين هذه البكتريا الداخلي تأثر عكسيا. لقد ظهرت تقارير عرضية تشير إلى مرور Bt خلال أجسام الحيوانات أو الطيور بدون أن تفقد نشاطها. لقد قام سمرنوف ومقلويد ، (١٩٦١) بتغذية الطيور والفئران على جرثيم Bt ووجد أن نسبة كبيرة من الجرثيم استمرت فعالة بعد مرورها في الجسم. الخلايا الخضرية للباسيلليس (Bt Atcc 107) تناقصت بمقدار ٩٠% في أربعة ساعات في كرش الأبقار بينما لم تنقص أعداد الجرثيم حتى بعد ٢٤ ساعة (أوفر وهارثمان، ١٩٦٥). وجود الجمبري وغيرها في الماء يقلل من الخفض الطبيعي للباسيلليس أسرائيلينسيس عن طريق التقلب المستمر للجسيمات المعدية (O'Brien Fry، ١٩٩٦). وجود بعض القشريات مثل الجمبري أنقصت من فعالة البكتريا الأسرائيلية في الماء تحت بعض الظروف.

العوامل غير الحيوية Abiotic factors: هناك عدد من العوامل اللاحيوية مثل الإشعاع الشمسي والحرارة والرطوبة تؤثر على ثبات Bt (ليونج وآخرون، ١٩٨٠). درجات الحرارة تؤثر على دوام معيشة Bt ولو أن الدرجات القاسية انخفاضا أو ارتفاعا قد تفقد الجرثيم نشاطها. أن نقص معيشة Bt في الحبوب المخزونة تتناسب طرديا مع درجة حرارة التخزين لقد اتضح أن المطر يسبب نقص حاد في فاعلية Bt على الأوراق. مع الديسيل استمر ٣١% فقط من الجرثيم الحية على الأوراق بعد مطر صناعي ١٠ ملليمتر وتتناقص إلى ١٢% مع ٥٠ ملليمتر و ٦% مع مطر ١٠٠ ملليمتر. لقد أظهرت بعض الدراسات أن الغسيل بالمطر (أقل من ٦ ملليمتر) كان هو المسبب الأول للسمية الباقية عندما استخدمت الثوروسيد LV 48 على الصنوبر. محاكاة المطر ٣ ملليمتر أزالت ما يقرب من ٥٠% من بروتين الباسيلليس كورستاكي من المجموع الخضري. الغسيل يمكن أن يزيل المستحضر ومن ثم يمكن تقليل الفقد والانجراف بالغسيل بإضافة المواد المثبتة لمحلول الرش (بيرجز وجونز، ١٩٩٨).

لقد أظهرت الدراسات على النظام البيئي الميكروكوزم أن الجسيمات المعلقة في الماء تقلل لحد كبير من نشاط وفاعلية الباسيلليس أسرائيلينسيس ضد يرقات البعوض. لقد

وجد الباحث أن التوكسينات المرتبطة على جسيمات المادة تصبح أقل في السمية بشكل غير عكسي. هناك بعض العوامل الأخرى التي تؤثر على ثبات الباسيليليس الإسرائيلية مثل التقلب وجودة الماء ومكوناتها مثل الملوثات وكذلك الظروف البيئية مثل درجة الحموضة ودرجة أقل درجة الحرارة. لقد وجد الباحثان شيران وفيشر (١٩٩٢) أن التقلب هو أكثر العوامل أهمية في صيانة ثبات جراثيم الباسيليليس الإسرائيلية والتيسر الحيوي للتوكسين الخاص بها. في هذه الدراسة يعمل القاع من خلال الوراثة على تقليل الفاعلية ضد يرقات العمر الثالث لبعوض الأبيدس إيجيبتي عن طريق زيادة ترسيب الجسيمات السامة ولكنه لا ينقص الثبات لجراثيم هذه البكتيريا.

ضوء الشمس يسبب خفض كبير في حيوية الجراثيم حيث وجد موريس ومور، (١٩٧٥) أن ضوء الشمس أدى إلى فقد نشاط جراثيم الباسيليليس كورستاكي بمقدار ٩٠% على أوراق الصنوبر في يوم واحد. في الظلام حدث فقد نشاط مقداره ٧٨% فقط في الجراثيم خلال ١٤ يوم. لقد أظهرت العديد من الدراسات حدوث فقد سريع في الفاعلية ضد الحشرات (خلال ساعات وحتى أيام) بسبب الانهيار بواسطة الأشعة فوق البنفسجية. مستحضرات جراثيم Bt والبلورات عندما جهزت في صورة كبسولات معا على حامل نشأ خالي من مانعات اختراق الأشعة فوق البنفسجية حدث فقد لحيوية جميع الجراثيم والنشاط الأبدى ضد الحشرات *D. nubilalis* خلال أربعة أيام ولو أن النشا نفسه يعمل كحاجز جزئي (ونكل وشاشا، ١٩٨٩). لقد قام الباحثان باجكي وشريف (١٩٨٩) بفحص تأثير التعرض للأشعة فوق البنفسجية UV على ٧ أنواع من Bt ووجدوا حساسية عالية في معظمها مع فقد النشاط زاد عن ٩٩% عند معدل واحد J/m^2 . هناك استثناءات تتطلب جرعة UV بين ١-٢ J/m^2 لأحداث فقد في النشاط مقداره ٩٩% كما في الباسيليليس الكندية، جاليري، أنديانا، ثوميسوني. كذلك يتوقع وجود اختلافات بين العزلات والسلالات لنفس تحت أنواع الباسيليليس. أظهرت دراسة معملية على الثبات الضوئي للديبيل AF 76 على المجموع الخضري للصنوبر بعد فترات مختلفة من التعرض للإشعاع أن النشاط الحيوي يتناقص مع زيادة دوام التعرض للإشعاع وزيادة شدة الإشعاع. لقد كانت نصف فترة الحياة تساوي ١، ٥ يوم مع شدة التشعيع القليلة في مقابل ٩، ٣ يوم مع الشدة العالية.

بينما أظهرت عدد من التقارير أن التشعيع بال UV له تأثير سالب كبير على دوام معبئسة جراثيم Bt فإن التأثير على التوكسينات غير واضح. تأثير الضوء على فقد النشاط يعتمد على طول موجة وشدة الضوء ووجود الأكسجين وطول مدة التعرض. لقد فشلت دراسات كثيرة في إيجاد أى تأثير من جراء التعرض لحزم قصيرة في مدى الأشعة فوق البنفسجية UV range على ثبات التوكسين أو قد يحدث انهيار بسيط. لم يتحصل بيرجز وآخرون، (١٩٧٥) على أى خفض في النشاط الأبدى على الحشرات لبلورات Bt ضد يرقات أبى دقيق بعد التشعيع بأشعة جاما أو للأشعة فوق البنفسجية ذات الموجات القصيرة. لقد وجد Pusztaï ، وآخرون (١٩٩١) مدى أشعة الشمس التى تحطم التوكسين كانت في نطاق ٣٨٠-٣٠٠ نانوميتر. لقد وجد ساندر أم وساندرام، (١٩٩٦) أن مستويات البروتين الكلى لم تنقص مع زيادة دوام التعرض للتشعيع أو مع زيادة شدة الإشعاع على أوراق الصنوبر ولو أن التحليل الحيوى ضد الحشرات أظهر هذا النقص مما يوضح أن البروتين يفقد نشاطه ولا يتحطم.

لقد استخدمت الواقيات ضد الأشعة فوق البنفسجية UV Protectants لتحسين ثبات Bt عندما تستخدم تحت ظروف تحتم التعرض للأشعة وضوء الشمس. لقد قام الباحثان جريجو وسبنس (١٩٧٨) بفحص أى أطوال الموجات في ضوء الشمس أكثر تحطما للباسيليس Bt. لقد وجد الباحثان أن فقد نشاط جراثيم Bt بواسطة ضوء الشمس يرجع في جزء منه الى الأطوال الموجية للضوء المرئي خاصة تلك الموجات القريبة من ٤٠٠ نانوميتر والتي يسهل امتصاصها بواسطة الجراثيم. لقد درست Liu وآخرون، ١٩٩٣ تأثير إضافة المادة الماصة للأشعة فوق البنفسجية في الضوء وهى الميلانين لتجهيز جراثيم وبلورات الباسيليس الإسرائيلية. لقد أتضح من عدد الخلايا والتقييم الحيوى للنشاط الأبدى ضد يرقات البعوض أن الميلانين من أفضل المواد الواقية من الضوء Photoprotective agent.

تأثير المستحضر على الثبات Effects of Formulation

الشركات التى تنتج الباسيليس Bt كمبيد حيوى تعاني من نقص الثبات كمشكلة تجابه استخدامات Bt وقد أجريت محاولات عديدة لتحسين الثبات من خلال تجهيز مستحضرات جديدة أو استخدام حاملات حيوية متنوعة (بيرجز وجونز، ١٩٩٨). مثال

ذلك ما أعلنه العديد من الباحثين عن استخدام النشا لعمل كبسولات توكسينات الباسيلليس كورستاكي (ماكجوير وشاشا ، ١٩٨٩ ، ماكجوير وآخرون ، ١٩٩٦). لقد أظهرت مستحضرات النشا هذه صفات تخزين جيدة وزادت من الثبات لأكثر من أسبوعين على أوراق القطن في الصوب الزجاجية ربما بسبب تحقيق الحماية ضد البيئة الكيميائية المعاكسة على سطوح أوراق نباتات القطن (ماكجوير وشاشا ، ١٩٨٩). لقد امتدت السمية في الحقول ضد اليرقات الصغيرة من ثاقبة الذرة عندما استخدمت كبسولات Bt كورستاكي المجهزة بنشا الذرة في زراعات القطن بالمقارنة بالباسيلليس كورستاكي التجارية في السنوات الرطبة وليس في السنوات الجافة. لقد استخدم Behle وآخرون ، (١٩٩٧ . B) جلوتيسن القمح المذاب حيث تمت إضافة لمستحضرات رش Bt كورستاكي لتكوين فليم يستطيع مقاومة الغسيل عند الجفاف. لقد أدت إضافة ١% (وزن : حجم) جلوتيسن الى المستحضرات الى زيادة كبيرة في تحمل درجات الحموضة المرتفعة عنه في حالة المستحضرات التقليدية مع مقاومة غسيل الباسيلليس كورستاكي بمطر صناعي سم. لقد أشار Boyant (١٩٩٤) أن رواسب الباسيلليس مع المادة اللاصقة قد تقاوم حتى ١٠ ملليمتر مطر دون حدوث فقد خطير في النشاط والفاعلية. المواد اللاصقة عبارة عن مواد إضافية تكون غلاف يرتبط بالراسب الجاف للباسيلليس على سطح الأوراق النباتية. سرعة المطر وأنهماره السريع تساهم لحد كبير في ثبات العديد من منتجات الباسيلليس كورستاكي فقد وجد ساندرايم وآخرون (١٩٩٣) عندما اختبروا ثمانية مستحضرات لمعرفة دور الهمار المطر على الثبات حدوث فقد كبير من ٤٧-١٠٠% في البروتين.

لقد تم تقسيم المستحضرات التي تعتمد على الكازين من حيث مقاومتها للأمطار (Behle وآخرون ، ١٩٩٦). عندما استخدمت على أوراق القطن وتعرضها لمطر صناعي وضوء شمس صناعي قاومت مستحضرات الكازين الغسيل وتم الاحتفاظ بأكثر من ٦٠% من النشاط ضد الحشرات الصغيرة من ثاقبة الذرة بالمقارنة بفاعلية ٢٠% مع تجهيزات Bt التجارية من الكازين. لقد حققت مستحضرات الكازين حماية من الضوء والانهياب المحفز بالألوكيميائيات بالمقارنة بالباسيلليس غير المجهزة. من الاتجاهات الأخرى لتحسين ثبات Bt تلك التي شملت التعبير عن جينات Bt والتوكسينات في بكتريا أخرى وهو الاتجاه الذي مازال في مراحله الأولى ولم ينجح على الدوام. لقد تم تطوير مستحضر تجاري MVP وهو يتكون من بكتريا البسيدوموناس فلوريينس المهندسة

وراثيا للتعبير عن جين الدلتا-أندوتوكسين للباسيلليس كورستاكي حيث تقوم الخلايا البكتيرية بكبسلة التوكسين. لقد اقترح بعض البحاا حدوث تحسين فى الثبات ولكن التقييم الحيوى للأوراق المرشوشة على يرقات العمر الثالث لحشرة بسيدوبلوزيا أنكلودنيس أظهر ثبات شامل للديبيل أفضل بكثير من ثبات MVP (Nyouki and Fuxa، ١٩٩٤).

نقص ثبات الباسيلليس الإسرائيلىة فى مناطق تغذية وتوالد البعوض فى الماء تمثل مشكلة كبيرة فى المكافحة، لذلك تم تطوير مستحضرات عديدة بهدف زيادة الثبات. تجهيز مستحضرات بطيئة الانفراد slow release حسنت من الثبات بدرجة فاقت المستحضرات السائلة مما نتج عنه إطالته الفعالية فى برنامج المكافحة من أيام وحتى أسابيع فى بعض الحالات. مثال ذلك مستحضر باكتيموس (Bt أسريلىنسيز) الذى حقق مكافحة كاملة ضد الأيسيدس إيجيبتي فى ماليزيا حيث منع خروج الفراشات تماما من الماء لمدة ٧٥ يوم من المعاملة (سليمان وآخرون، ١٩٩١). أن التعرض للأشعة فوق البنفسجية UV تعتبر العامل الأساسى المسئول عن نقص الثبات فى مستحضرات الباسيلليس ومن ثم اضعف للعديد من مستحضرات البكتيريا مواد واقية ضد هذه الأشعة. هذه قد تكون مركبات قادرة على امتصاص أشعة UV أو مواد مكبسلة. مازال البحاا يبذلون الجهد الكبير فى إيجاد مواد واقية ضد الأشعة فوق البنفسجية. حديثا وجد راجى، (١٩٩٨) أن مركب Shellac واقى ممتاز ضد الانهيار الضوئى يحقق الفاعلية ذات الأثر الباقي الطويل ضد الحشرات للباسيلليس.

طرق ومعدلات الاستخدام Application methods and rates

اختيار طريقة المعاملة على الأرض وفى الماء ذات أهمية كبيرة من ناحية الأخطار البيئية لأنها تحدد انتشار الباسيلليس ومدى تعرض الكائنات غير المستهدفة وحتى استقرار الجرعة. يمكن إجراء التطبيق عن طريق السكب فى الماء والرش (بما فيها الحجم المتناهي فى الدقة) أو الرش الجوى وكذلك من خلال المستحضرات الخاصة مثل الكبسولات أو القوالب briquettes. لقد أستخدم الرش الجوى فى عمليات المكافحة خلال الحملات القومية وفى الغالب يستخدم تكنولوجيا الرش المتناهي فى الدقة ULV.

لقد أوضح ساندرا وساندرا (١٩٩٦) أن حجم القطرة يؤثر على دوام فعالية الباسيلليس. لقد وجد أنه مع القطرات الكبيرة (٢٥٠ ميكرومتر) كانت نصف فترة الحياة

حوالي ٢٦ ساعة ضد الفراشة الغجرية بينما كانت مع القطرات الأصفر (٤٢ ميكروميتر) ١٢ ساعة فقط للباسبيليس. لقد كان الثبات على أوراق البلوط لقطرات أعلى من ١٣٠-١٦٠ ميكروميتر غير مرتبط بحجم القطرات. المستوى الأول للعدوى المستخدم قد يؤثر على ثبات الباسبيليس. المستويات العالية من العدوى قد يتطلب أنهيها وقتا طويلا (بيكويث وستيلزر، ١٩٨٧) اللذان استخدمما ٢٠ ، ٣٠ بليون وحدة دولية/ هكتار رش جوى بواسطة طائرات الهليكوبتر ضد حشرة *C. occidentalis* في أوريجون. لقد اشار هذان الباحثان أن معدل فقد الفاعلية كان أقل أهمية من الموت الابتدائي لليرقات في إنجاح تطبيقات الباسبيليس. على العكس من ذلك فإن الجرعات الزائدة من Vectobac 12 AS لم يطيل من دوام الفاعلية بشكل معنوي ضد يرقات البعوض ولو أن مجاميع الحشرات المعاملة لم تشفى وتصل إلى نفس المستوى بسبب زيادة الافتراس (Mulla وآخرون، ١٩٩٣).

الكشف عن الباسبيليس والتوكسينات في البيئة

تراكم وثبات توكسينات الباسبيليس في التربة وغيرها من أماكن المعيشة والتي تستخدم في إبادة الحشرات قد تؤدي إلى حدوث أخطار في البيئة مثل السمية على أنواع غير المستهدفة والانتخاب تجاه تطور المقاومة في الأنواع المستهدفة. لذلك فإن الطرق الحساسة للكشف عن الباسبيليس Bt وتوكسيناتها في البيئة مطلوبة. يوجد العديد من الطرق تستخدم في الكشف عن Bt في البيئة. الكشف باستخدام الأطباق مع بيئة متخصصة تستخدم على نطاق واسع (مارتن وترافرز، ١٩٨٩). لقد طور اكيبا وكاتو، ١٩٨٦. بيئة متخصصة لنمو الخلايا الخضرية للباسبيليس موريسوني و Bt ثورينجينسيز ولو أن الجراثيم لم تثبت عليها. لقد أعلن Yosuten وآخرون ، (١٩٨٢) عن بيئة خاصة للباسبيليس أسريثينيسيز. التوكسينات الأبدية ضد الحشرات يمكن قياسها بشكل غير مباشر باستخدام التحليل الحيوي نحو بعض الآفات المختارة مثل دودة الشمع. من الطرق الأخرى للكشف عن التوكسينات الداخلية اختبار الأليزا Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (تاكاهاشي وآخرون، ١٩٩٨) واستخدام المناعة بالفلورسنتس (west وآخرون، ١٩٨٤). هذه الطرق لا توضح ما إذا كانت التوكسينات تعرضت لفقد النشاط لأن هذا يتم تحديده من خلال التحليل الحيوي. لقد قام الباحثان Tapp and stotzky،

(١٩٩٧) بتطوير استخدام الطريقة الخلوية المناسبة Flow cytometry كطريقة للكشف ودراسة مآل توكسينات الباسيلليس في التربة وهذه لا تتطلب الاستخلاص والتنقية. التوكسينات الباسيلليس كورستاكي و Bt يتتيربيونس ترتبط على الطين أو جسيمات السلت. لقد تم الكشف عن التوكسينات بقياس الفلورسنس بعد تحضير معقدات الجسم توكسين مع الجسم المضاد في الأرنب لتوكسين Bt تنيبيرونس ثم التحضين مع المضاد الفلوريسيني للجسم المضاد في الأرنب. لقد ثبت أن هذه الطريقة أكثر حساسية عن تلك التي سبق تطويرها بواسطة الأليزا dot blot Elisa

لقد استخدمت الطرق الجزيئية للكشف عن Bt. لقد استخدم الباحث Damgaard تفاعل سلسلة البوليميز (PCR) وبانداته التي تستهدف جين - Phosphatidylinositol specific phospholipase للباسيلليس Bt للكشف عن البكتريا في التربة.

الفصل الثاني

العوامل البيئية وتلك المرتبطة بالحشرات التي تؤثر على سمية ونقل ونشر الباسيليليس

أولاً: العوامل التي تؤثر على سمية الباسيليليس:

الباسيليليس بكتريا حية ترتبط ببلاورات التوكسين الداخلي ومن ثم فهي تتعرض لعدد من التأثيرات البيئية والحشرية. العديد من العوامل البيئية تقلل من الثبات وما قد يستتبع ذلك من تقليل الأخطار على الكائنات غير المستهدفة. فاعلية الباسيليليس قد تتأثر بالعوامل الأحيوية ومثال ذلك أن الفاعلية في الماء انخفضت في ظروف الحرارة الواطية والجودة الواطية للماء، هذا بينما العوامل الأحيوية لم تؤثر على فاعلية الباسيليليس بنفس الدرجة كما في الممرضات غير المنتجة للتوكسينات. العوامل الطبيعية في المجارى المائية وعلى سبيل المثال النموات الخضرية الموجودة قد تؤثر كذلك على الفاعلية : هناك عوامل أخرى مثل الغذاء النباتي للحشرات وطور تطور الحشرة ذات تأثير أكبر على السمية. بوجه عام وجد أن الباسيليليس Bt أكثر فاعلية ضد اليرقات الصغيرة عن اليرقات الكبيرة كما أنها ليست فعالة ضد كل الأطوار الحشرية. لقد أتضح أن نوع الورقة النباتية التي تتغذى عليها اليرقات ذات تأثير كبير على السمية حيث وجد أن لبعض النبات تزيد من السمية وتحفزها بينما البعض الآخر يثبط من سمية الباسيليليس. سلوك التغذية في الحشرات يحدد كمية العدوى التي يتم تناولها والتي تؤثر بالتبعية على الحساسية. درجة الحرارة والرطوبة قد تؤثر على تغذية الحشرات وعلى كمية العدوى التي تستهلك. هناك عوامل أخرى مثل التوزيع بواسطة الحشرات غير الحساسة والتي تؤثر على المساحة ومدى الكائنات الموجودة تحت الخطر بعد المعاملة بالباسيليليس .

العوامل البيئية : Environmental factors

لقد نوقش في الفصل الأول من هذا الباب تأثير العوامل غير الحيوية على ثبات التوكسينات والجراثيم وقد خلص الباحثون إلى أن الإشعاع الشمسي والمطر الساقط يعتبران من العوامل المحددة التي تقلل من ثبات الباسيليليس على النباتات والأسطح غير المحمية. درجات الحرارة والرطوبة ذات تأثير كبير على الفاعلية بدرجة تفوق تأثيراتها على الثبات. درجة الحرارة العالية تزيد من السمية حيث أنها تزيد من فعالية التوكسينات بوجه عام. الحرارة ذات تأثير أكثر أهمية على كفاءة الباسيليليس من خلال فعلها على الحشرة

حيث أن رفع درجة الحرارة يزيد من معدل التمثيل في الحشرة وكذلك المعدل الذي عنده تستغذى الحشرات وتستهلك Bt. رفع درجة الحرارة يسرع كذلك من تطور البكتريا داخل الحشرة. بوجه عام وجد أن Bt أكثر سمية على درجات الحرارة المرتفعة كما أنها تكون غير فعالة في الحقول التي تقل فيها الحرارة عن 15°C (فرانكين هويزن ١٩٩٠ - ط) بسبب خفض التغذية بواسطة الحشرة المستهدفة. المنتج الروسي الأنتوباكثيرين Entobakterin (الذي يعتمد على Bt جاليري) يفقد فعاليته ضد عدد من الحشرات على درجة حرارة أقل من 18°C (Sikura ، ١٩٧٦) كما أنه عديم الفاعلية ضد الفراشة الغجرية تحت ظروف متوسط حرارة يومي 13°C (korchagin ، ١٩٨٠). الحرارة المناسبة لأحداث السمية على يرقات الفراشة الغجرية حوالي 25°C (Ghlani ، ١٩٧٨). الباسيلليس كورستاكي لا تقتل يرقات دودة ورق القطن على 18°C في البيئة الصناعية في المعمل. مع حشرة ثاقبة الذرة وجد أن Bt (غير موصفه) سبب زيادة في نسبة الموت مع ارتفاع درجة الحرارة لأكثر من 26°C وسجلت أعلى نسبة موت على درجة حرارة 36°C (Sharma وآخرون ، ١٩٩٨).

ارتفاع درجة الحرارة 26°C يزيد من موت يرقات الحشرات ومنها C.rosaceana التي تتغذى على أوراق التوت المعاملة بالباسيلليس كورستاكي في المعمل (Li وآخرون، ١٩٩٥). مع يرقات هذه الحشرة على أشجار البلسم أنت درجات الحرارة بين 13°C ، 25°C إلى التأثير على إضطراب الموت وليس مستوى الموت التراكمي خلال ١٤ يوم من التغذية على الأوراق المرشوشة. لقد تناقصت الفترة اللازمة لقتل نصف اليرقات المعاملة LT 50 من ١٢-١٧ يوم على درجة 13°C إلى ٢-٤ أيام على درجة 25°C تبعاً لكثافة القطرة (فرانكين هويزن ، ١٩٩٠ - ط). لقد وجد نفس الباحث عام ١٩٩٤ أن تأثير الحرارة على إضطراب المرض ترجع إلى تأثيره على تكبير وتضاعف الخلايا الخضرية في اليرقات المصابة. لقد كان الصنف السيروولوجي وهو Bt سان ديغو (= تينبيريونيس) أقل فعالية ضد العمر الأول من يرقات L.Decemlineata عند درجة حرارة 18°C بالمقارنة بدرجات ٢٨-٣٣ $^{\circ}\text{C}$.

درجة حرارة الماء لها نفس تأثير حرارة الهواء حيث تزداد السمية مع درجات الحرارة المرتفعة. معظم البيانات المنشورة عن حرارة الماء كانت مع البعوض وتحت أنواع الذباب الأسود مع المعاملة بالباسيلليس أسرائيلينسيس حيث أعطت الحرارة المنخفضة (5°C) قيم LC_{50} ، LC_{90} عشرة أمثال ضد البعوض في تجارب التقييم الحيوي بالمقارنة بالتقييم على درجات الحرارة المرتفعة (25°C) (بيكر وآخرون ، ١٩٩٢). بالرغم من أن

السمية على البعوض انخفضت مع حرارة أقل من ١٩°م مع الباسيلليس الإسرائيلية إلا أن بعض السمية قد سجلت مع درجات حرارة أقل من صفر درجة مئوية (وكر، ١٩٩٥). هناك بعض التقارير عن تأثير حرارة الماء على سلالات Bt الأخرى. لقد زاد نشاط وفعالية الباسيلليس دارستادينسيز ضد العمر الرابع من يرقات البعوض الكيوليكس مع زيادة درجة الحرارة بين ١٨-٣١°م (لاس واولداكر، ١٩٨٣). الاختبارات المعملية التي أجريت في الاتحاد السوفيتي سابقا أظهرت أن سمية مستحضر أندوباكتيرين (باسيلليس جاليري) ضد يرقات بعوض الأبيدس في الماء زادت مع زيادة درجة الحرارة مع نسب موت ٦، ٢٢، ٤٣، ٧، ٧٢% على درجات حرارة ١٥، ١٩، ٢٥°م على التوالي بعد ٤ أيام (سوبينوف، ١٩٧٣).

لقد أدى انخفاض الحرارة إلى تقليل كمية التغذية بواسطة الحشرات المستهدفة مثال ذلك أن حرارة الماء المنخفضة تقلل تغذية يرقات البعوض والذباب الأسود والذي قد يرجع مباشرة إلى المستويات القليلة عنف من الباسيلليس الإسرائيلية (وكر، ١٩٩٥). لم تتغذى يرقات حرشفية الأجنحة كثيرا مع درجة حرارة أقل من ١٧ - ١٨°م وهذا قد يفسر مخرجات العديد من التقارير عن ضعف الفاعلية في الحقول مع تجهيزات الباسيلليس على درجة حرارة أقل من ١٨°م (فينيوف وأخرون، ١٩٨٠). قد يكون للرطوبة تأثيرات ضارة على سمية الباسيلليس. لقد أتضح دور الأمطار في غسيل جراثيم وبلورات البكتريا من على أوراق النباتات ولو أن رش الأوراق المبلولة في المعمل بالباسيلليس Bt لم تخفض من السمية على يرقات الحشرة C. Fumiferana بعد يوم من المعاملة بالمقارنة مع السمية على المجموع الخضري الجاف. على العكس من ذلك وجد عفيفي ومطر (١٩٧٠-١٩٧٠-ط) أن نقص الرطوبة في بيئة تربية حشرة إيفستيا كوهينيل زادت من نسبة الموت بسبب بكتريا Bt (بيوسبور ٢٨٠٢) ولكن هذا التأثير لا يرجع للتأثير المباشر لتغيير الرطوبة على اليرقات. بوجه عام وجد أن الرطوبة تغير من فاعلية Bt ولكن أقل مما تحدثه الحرارة وقد يرجع ذلك بداية إلى الفعل على المعدل الذي عنده تتغذى الحشرات أو تتطور.

سلوك تغذية الحشرة Insect Feeding behaviour

لقد أتضح أن العديد من الحشرات تميل إلى الحركة من الأوراق النباتية الملوثة بالباسيلليس Bt عما هو الحال مع الأوراق غير المعاملة أو أوراق المقارنة المعاملة وفي بعض الحالات أتضح أن مستحضرات Bt أو البلورات ذات فعل طارد لتغذية الحشرات. أظهرت يرقات الدودة القارضة حديثة الفقس وتلك ذات العمر الثالث تجنب واضح للغذاء

المعامل ببكتريا Bt (cry Ic) (بيرديجو وآخرون ، ١٩٩٦). أظهرت العديد من الدراسات الأخرى أن يرقات الدودة القارضة تتجنب الطعام الملوث بمركبات Bt . في اختبار الاختيار التفضيلي choice test تجنبت يرقات L. dispar الغذاء أو أوراق البلوط المعاملة بالباسبيليس. عندما قدمت أقراص أوراق البلوط الى يرقات الحشرة بعد معاملة الأوراق بالبلورات فقط اتضح فرق في التغذية بالمقارنة بأقراص الأوراق المعاملة بالماء فقط. لقد خفضت Bt بشكل معنوي من معدل التغذية على أوراق الكرنب لحشرة بلويتلا زيلوستيلا و L.decemlineata (هوى وهاك، ١٩٩٣). يرقات دودة اللوز الأمريكية حديثة الفقس تجنبت الأوراق النباتية المعاملة بتركيزات متوسطة وعالية من التوكسينات في اختبار الاختيار مع الباسبيليس كورستاكي (جولد وأندرسون ، ١٩٩١). لقد تجنبت يرقات حشرة مامبسترا براستيا الأوراق المعاملة بالباسبيليس Bt (باكتوسبين) (Espinell ، ١٩٨١)، على النباتات فقدت يرقات العديد من الحشرات التوافق والاتساق عندما أكلت أوراق نباتية مرشوشة بالوراث الباسبيليس وأصبحت فائقة النشاط مع ميل للسقوط من على النباتات مما يؤدي الى حصول اليرقات على جرعات تحت مميتة.

على العكس لم تتجنب يرقات العمر الرابع من خنفساء كلورادو البطاطس أوراق البطاطس المعاملة بالباسبيليس تينبيريونيس في اختبار الاختيار التفضيلي كما أنها لم تترك الأوراق غير المعاملة مع المعاملة (فيرووليون ، ١٩٩١). الباسبيليس تينبيريونيس (Novodor Fc) لم تطرد هذه اليرقات من التغذية في المعمل وكذلك في التجارب الحقلية في نيوجرسي (شيديو وآخرون، ١٩٩٦). اليرقات والحشرات القاتلة لخنفساء الكلورادو لم يحدث لها تأثير سلوكي طارد بل أنه في بعض الحالات كانت تحدث زيادة ونشاط ابتدائي في التغذية مع وجود مستحضر M-one (باسبيليس تينبيريونيس مكبس في خلايا البسيدوموناس) على الأوراق. في الماء فإن المنطقة التي تتغذى فيها الحشرات قد تحدث عند التعرض لمستويات مختلفة من العدوى بالباسبيليس مثال ذلك أن الكيوليكس تتغذى عادة في عمود الماء بينما أنواع بعوض الأبيدس يتغذى على مواد في الوسط وهذا يعني أن هذين الجنسين سوف يتناولان معدلات مختلفة من الجسيمات المستقرة للباسبيليس الإسرائيلية. أنواع الأنوفينيس تتغذى بداية عند السطح بينما البكتريا الإسرائيلية تبقى لفترة قصيرة من الوقت فقط (Mulla ، ١٩٩٠) ومن ثم فهي تتعرض لفترات قصيرة عن الأنواع التي تتغذى في محيط الماء كله بالإضافة إلى ذلك فإن معدلات الترشيح تختلف بين الأحاس والأنواع مثال ذلك ما قام به Aly ، ١٩٨٨ من قياس معدلات الترشيح في ثلاثة أنواع من البعوض ووجدها ٦٣٢ مليلتر/يرقة/ساعة مع الأبيدس، ٥١٥ للكيوليكس

كويننسكياش أو ٩، ٨٣ مع الأنوفيلس البيسانس. هذا أدى الى تأثير مفاده أن أنواع الأنوفيلس أقل حساسية بوجه عام للباسيليلس الإسرائيلية عن أنواع الكيوليكس أو الأبيدس. لقد اقترح محمود (١٩٩٨) أن يرقات الأبيدس كانت أكثر حساسية للباسيليلس الإسرائيلية عن الأنوفيلس بسبب معدلات التغذية الأسرع. الأبيدس تتناول ٥، ١١ مرة من الجراثيم أكثر مما تتناوله الأنوفيلس مما يؤدي إلى قيم قليلة منخفضة لمعيار LT_{50} (الوقت اللازم لقتل ٥٠% من اليرقات).

في دراسات حقلية عن تأثيرات الباسيليلس كورستاكي غير المستهدفة وجد Wagner وآخرون، ١٩٩٦ تأثيرات قليلة على بعض حرشيات الأجنحة الدقيقة وهذا يرجع إلى سلوك التغذية ومكان المعيشة بدرجة أكبر من الحساسية الواطية للباسيليلس. اليرقات التي لم تتأثر تقوم بلف الأوراق والاحتواء فيها أو تحفر في النباتات مما يقلل من تأثيرات جراثيم وبلورات الباسيليلس.

عوامل التربة Soil Factors :

كما ذكر قبل فإن الباسيليلس Bt قد يرتبط مع جسيمات التربة مما يقلل من كمية التوكسين المنهار وزيادة السمية الباقية. مثال ذلك فإن Bt كورستاكي ، Bt تينبيريونيس تدمص بسرعة (٧٠% من الأدمصاص تحدث خلال ٣٠ دقيقة) على سطح جسيمات الطين وقد فشلت عملية الغسيل بالماء في إزالة الكثير من المادة المدمصة (Topp وآخرون ، ١٩٩٤). لقد كانت التوكسينات المدمصة لهذين النوعين من الباسيليلس سامة على اليرقات من حشرات ماندوكاسيكستا وخنفساء كلورارو البطاطس وفي بعض الأحيان يؤدي الارتباط على سطح حبيبات الطين إلى تحفيز النشاط الإبادي ضد الحشرات (تاب وستوتزكي، ١٩٩٥). لقد اتضح أن إدمصاص توكسين الباسيليلس كورستاكي كان أعلى في التربة الطينية عما هو الحال مع التربة الرملية (ساندرا، ١٩٩٦). لقد وجد كلينر وآخرون (١٩٩٨) علاقة بين نتروجين التربة ، تقليل وزيادة فعالية توكسين Cry I Aa ضد الفراشة الغجرية على أوراق الحور. التيسر القليل للنيتروجين زاد من موت اليرقات وأطال من فترات التطور في يرقات العمر الثاني التي تغتذ على الأوراق المعاملة بالاندوتوكسين للباسيليلس Cry I Aa.

عوامل الماء Water Factors :

بالإضافة إلى عوامل الحرارة وكثافة الحشرات ومستوى العدوى التي نوقشت قبل وجد أن العوامل التي تؤثر على كفاءة الباسيليلس في الماء هي درجة الحموضة والملوحة

وجودة الماء. لقد تبين تأثيرات رقم الحموضة PH على الفاعلية ولكن بعض البحوث أشاروا إلى أن زيادة حموضة الماء تزيد من موت الحشرات المستهدفة. مثال ذلك أن موت حشرة Simulim التي تسببت بواسطة Bt الأسرائيلية زاد مع الحموضة. الاستجابة لرقم الحموضة تختلف بين أنواع الحشرات. لقد كان مستحضر الأنتوبكتيرية (Bt جاليري) ضد يرقات الأبيدس كاسبس أكثر سمية على درجة حموضة (٧) عنه مع حموضة (٤) بالرغم من أن الحموضة كانت ذات تأثير قليل على أنواع calicoides وغيرها (ساوبينوفار ١٩٧٣). أظهرت الاختبارات الحقلية ضد الكيوليكس ترساليكس أن كل مستحضرات الباسيلليس الإسرائيلية كانت أقل فاعلية في الماء ذات الحموضة الأعلى من ٨ (Mulla وآخرون ، ١٩٨٠).

لقد أشارت الدراسات استجابات مختلفة للملوحة. عند مستويات ٤ ، ١٤ ، ٦ ، ١٣٥ ، ٢ ، ٢١٥ ملليم كافى من كلوريد الصوديوم التي وصلت نسبة الموت في يرقات الأبيدس كاسبس إلى ٩٨ ، ٦ ، ٨٠ ، ٦ ، ٤٣% على التوالي بعد سبعة أيام من المعاملة بالانتوبكتيرين. على العكس كان للملوحة تأثير قليل على حساسية اليرقات الأبيدس فلافيسنس (ساوبينوفار ، ١٩٧٣). لقد وجد الباحث بالارمان وآخرون (١٩٨٣ - b) أن الباسيلليس الإسرائيلية ظل نشاطها ثابت تحت مدى عريض من الملوحة ضد أنواع الكيوليكس والأنوفيليس. ١% ملوحة لم تغير من خصائص العلاقة بين الجرعة والموت للأبيدس والكيوليكس عندما تعرضت للباسيلليس الإسرائيلية (Rasnitsyn وآخرون ، ١٩٩٣).

جودة الماء معبرا عنها بالملوثات والجسيمات العضوية وغير العضوية قد تؤثر على السمية. يبدو أنه توجد علاقة بين التلوث العضوي والجرعة المطلوبة لقتل البعوض مع الباسيلليس اسرائيلينسيس بسبب مادة خارجية تؤدي إلى تناول Bt جاليري (انتوبكتيرين) ، Bt ثورنيجيسنيز (باكتوسين) و Bt كورستاكي (ديبيل) وجدت غير سامة على يرقات Chrysoperia carnea ولكنها كانت عالية السمية على الحشرات الكاملة حيث أحدثت ٧٥% موت. البيض لا يعتبر حساس بشكل مباشر للباسيلليس ولو أن اليرقات التي تفقس من البيض لحشرة دودة اللوز الأمريكية المعامل بالباسيلليس كورستاكي حدث لها موت عالي عن المقارنة (على وواطون ، ١٩٨٢ - ا). بيض حشرة B. selenaria المعامل بالباسيلليس كورستاكي يحدث فيه فقس لليرقات ولكن لا يستمر في المعيشة سوى ٢،٢% (Izhar وآخرون ، ١٩٧٩). اليرقات حديثة الفقس لبعض أنواع الحشرات تأكل غلاف البيض بعد الفقس مما يفسر حدوث هذا الموت.

الكائنات الأخرى: Other Organisms

فى الماء تقوم الكائنات التى تعيش فيها بتقليل عدد جراثيم Bt والبللورات المتاحة ومن ثم تقل الفعالية ضد الحشرات المستهدفة. مثال ذلك أن التنافس فى تناول الغذاء بواسطة مرشح الغذاء دافنيا كيرفيريوستريس أدى الى خفض موت يرقات البعوض بعد المعاملة بالباسبيليس ثورنيجنسيز (بيكروآخرون، ١٩٩٢). فى بعض الحالات لا تعمل الحشرات الحساسة كناقلات للعدوى بالبكتريا Bt كما فى النقل على واضعات البيض لأشباه الطفيليات أو الانتشار بواسطة المتر ممات التى تأكل الجيف، بينما تعمل هذه الكائنات على نشر جراثيم Bt إلا أنه يستحب أن تكون على مستوى عدوى منخفض. نظرا لدور البكتريا Bt. كبكتريا تحدث العدوى طبيعيا أو صناعيا فإنها قد تتداخل مع الميكروبات الأخرى. فى بعض الحالات خارج الكائنات الحية وجد أن Bt لها خصائص مضادة للبكتريا. لقد أشار قافريت ويوسن (١٩٨٩) أن سلالة Bt ثورنيجنسيز أظهرت نشاط مضاد للبكتريا ضد ٤٨ من بين ٦٥ سلالة من Bt وكذلك ضد بعض الأنواع الأخرى الموجبة لجرام وليست مع الأنواع السالبة لجرام فى تجربة حقلية أجريت فى السويد تم نشر سلالة Bt أستريلينسيز المقاومة لأستربتومايسين فى المستنقع وتم استكشاف التأثيرات على بكتريا أخرى. لقد حدث زيادة طفيفة وانتقالية للبكتريا الشبيهة بالباسبيليس استقرت السلالة المتحررة على أعداد قليلة وخارج منطقة الانفراد. بعد سبعة أسابيع من الانفراد لم يتم الكشف عن تأثيرات باقية على المجموع الكلى للبكتريا (Eskils and Lovgren، ١٩٩٧). أظهرت التجارب المعملية أن السلالة التى نشرت تنمو فى تربة غير معقمة أو معقمة وكان هذا النمو بطيئا وانتقالى وسطى فى التربة غير المعقمة. بعض ميكروبات التربة تضاد Bt بدرجة تتوقف على المحصول ولكن فى دراسة واحدة ثبت أن البكتريا كانت أكثر المجاميع المضادة.

البكتريوفاج Bacteriophage:

البكتريوفاج عبارة عن فيروسات تهاجم البكتريا ومن ثم تقلل من فاعلية وكفاءة المواد التى تكافح البكتريا. لقد أظهرت عدد من الدراسات أن البكتريوفاج يتحصل عليه من سلالات الباسبيليس Bt (Bal-man) وآخرون ١٩٨٨ ، كسندا وإيزاوا ١٩٨٩ ، Inal وآخرون، ١٩٩٢ ...). البكتريوفاج التى تثبط الباسبيليس اسرئيلينسيز وجدت فى ٩ من بين ١٢ موقع معيشة استكشفت فى مصر (Ali وآخرون، ١٩٩٣). لقد نشر عن عدوى بالبكتريوفاج خلال عمليات التخمر لإنتاج Bt (Wu وآخرون ، ١٩٩٨). فى أمريكا وجد

أن العدوى فى Bt جاليرى تقل من النمو فى التخمير الصناعي ولذلك يصبح ضروريا استبدالها بتحت أنواع أخرى من Bt لاستكمال الإنتاج (بيرجز H.D). لقد حسن Azizbekyan وآخرون (١٩٩٦) سلالات Bt من النوع الملتهم باستخدام ١٢ سلالة أكولة مما أدى إلى الحصول على ٣٧ نوع أو طرز ملتهم من بين ٤٥ صنف سيروولوجى ثم اختبرها. لقد أظهر هذا العمل وما سبقه أن تقييم سلالات Bt تبعاً للحساسية للبكتريوفاج المختلفة تتمشى مع التقييم المقبول عن الطرز السيروولوجية.

لقد ذكرت قليل من التقارير عن تأثير البكتريوفاج على أداء Bt فى الحقول. لقد أشار Skvortsova وآخرون، (١٩٧٦) أن التلوث بالانتوبكتيرين مع الفاج تنقص الفعالية البيولوجية له بمقدار ٥٥، ٣٣% عن النشاط العادى. لقد ذكر حسين وآخرون (١٩٩٠-١٩٩١) أن بعض الفاج للباسيلليس إسرائيليسيز تقلل من الفاعلية ضد الكيوليكس بيبيز إضافة على ذلك فإن الفاج للباسيلليس سيريس و B. سفيركس تستطيع مهاجمة Bt الإسرائيلية مع تأثير تثبيطى على النشاط الأبدى على الحشرات (حسين وآخرون، ١٩٩١) وكان الفاج الموجود فى Bt إيزاوايا قادر على تكوين ليسوجين ثابت مع الباسيلليس سيريس (رينولدز وآخرون، ١٩٨٨). الفاج ليس له تأثير مباشر على الفاعلية بعد التطبيق حيث أن السمية Bt تعتمد على بلورات البروتين وليس على الخلية البكتيرية.

ثانياً: نقل ونشر الممرضات الحشرية : Transmission and Dispersal :

النقل والنشر من العوامل المحددة لنجاح الممرضات الحشرية. النقل من حشرة لحشرة أخرى ضعيف فى العادة وقد لا يوجد مع الباسيلليس Bt كما أن نجاحه كمبيد حيوي لا يعتمد على معاودة العدوى للحشرات. تدوير الباسيلليس فى مجموع الحشرات المستهدفة غير متوقع الحدوث بعد التطبيق التجارى حيث أن Bt تعمل كتوكسين أكثر من عملها كممرض معدي فى معظم الحالات. عوامل النقل والانتشار التى تؤثر على إيكلوجية البكتريا تشمل المطر والاقتراس ووجود المفترسات وأشباه الطفيليات والكائنات غير الحساسة بما فيها الطيور والثدييات الصغيرة. الرياح تستطيع محل الباسيلليس Bt حتى ٣ كيلو متر من موقع المعاملة. إن قلة البقاء والقابلية المحدودة لنوام العدوى فى مجموع الحشرات تحدد من التوزيع المؤقت والمكانى للباسيلليس Bt. مع ضعف النقل بين الحشرات الحساسة فإن النشر المحتوم يؤدي إلى خفض فى كثافة العدوى مما يفسر عن قليل من السمية فى اتجاه التيار.

النقل الأفقي Horizontal transmission:

بوجه عام لا تعتبر بكتريا Bt ممرض معدي شديد ضد الحشرات ولا يحدث لها تجرثم بشكل دائم في الحشرات قبل أو بعد الموت. هذا يقلل من تدوير البكتريا والتي تقلل بدورها المخاطر البيئية من الباسيلليس Bt حيث أنها غير ثابتة في معظم مجاميع الحشرات بعد التطبيق. لذلك فإن النقل الأفقي يكون محدود مقارنة بمعظم الممرضات الحشرية. لقد قام الباحثان Takatsuka and kunimi (١٩٩٨) بدراسة نقل الباسيلليس أيزاوايا بواسطة يرقات العمر الخامس للأفستيا كوهينيل. لم يسجل النقل بعد العدوى في اليرقات وإدخال اليرقات المعدية والصحية في عبوات في نسب متفاوتة. هذا على عكس ما يحدث مع epizootics في حشرة البلوديا التي تسببت بواسطة إدخال ١٠^٤ جرثوم في أجزاء اليرقة الميتة (بيرجز وهرست ، ١٩٧٧). الاختلاف قد ينتج من الملاحظة بأن في المنتجات المخزنة لا تستطيع حشرفيات الأجنحة افتراس اليرقات الحية ولكنها تقوم بأكل الجثث. لقد اعتبر بيرجز وهرست، (١٩٩٧) أن افتراس الجثث المعدية كان الوسيلة الأكثر فاعلية للنشر الطبيعي للباسيلليس Bt في دراسات على البلوديا والأفستيا والجاليريا.

العديد من الحشرات التي تقتل بواسطة استخدام الباسيلليس Bt لاتعصد التجرثم. الفشل في التجرثم يتسبب من جراء الجفاف السريع لليرقات حديثة الفقس والجثث الصغيرة أو بسبب النمو الزائد للنمو الخضري الهوائي للباسيلليس وتطوره في تجويف الجسم بواسطة التنافس مع كائنات المعدة والتي تتحقق من خلال الحدوث السريع للظروف اللاهوائية عندما يتوقف تنفس الحشرات عند الموت. هناك العديد من التقارير عن التجرثم في الجثث. درجات الحرارة العالية (٣٤°م بالمقارنة ١٠-١٩°م) تحفز وتناسب التجرثم في جثث حشرية الأجنحة (كاتاجيري وشيمادرز، ١٩٧٤). وقد اتضح أن الظروف التي تناسب التجرثم لا تحدث دائما. في حشرة البلوديا وغيرها من حشرات حشرية الأجنحة في المواد المخزونة تكون العدوى الطبيعية لمادة خفيفة وتحدث أساسا في الهياكل المحمية مثل الغذاء المخزون. لقد لوحظت حالات وفاة عالية بشكل عرضي وكان التجرثم عادي الحدوث في هذه الحشرات (Burges and Hurst ، ١٩٧٧).

الانتشار Dispersal :

انتشار الباسيلليس Bt يرتبط بالرياح والمطر وافتراس الحشرات المعدية المصابة والانتقال بواسطة الكائنات غير العوائل والحشرات المعدية المتحركة قبل الموت والطيور والثدييات. المطر قد يكون واحد من أكثر العوامل أهمية (Akiba ، ١٩٩١). تساقط

المطر يحرك جراثيم Bt من أوراق الكرنب إلى سطح التربة (بيدرسين وآخرون، ١٩٩٥) وهو من أكثر العوامل شيوعاً التي تؤثر على الثبات على المجموع الخضري للنباتات. الباسيليليس يمكن أن تستحرك لأسفل في بروفيل التربة بواسطة الري أو المطر. بعد الاستخدام التجاري فإن جراثيم الباسيليليس Bt تحمل بواسطة انجراف الرش وتيارات الهواء. لقد أشارت أحد الدراسات أن تيارات الرياح على طول الوادي تحمل Bt لأكثر من ١٥ كيلو متر من نقطة التطبيق كما تسمح الرياح بالمرور فوق الحواف حتى ٣٠٠ متر أعلى من النقطة التي استخدمت عندها (جريسون وآخرون، ١٩٧٦). كما نوقش قبلاً فقد قام Whaley (١٩٩٨) وآخرون بدراسة انجراف الباسيليليس كورستاكي بعد المعاملة في يوتا وقد وجد أن حدوث موت للحشرات يرتبط بالباسيليليس على بعد ٣٠٠٠ متر من نقطة المعاملة. لقد سجل نقل الباسيليليس بواسطة المفترسات وأشباه الطفيليات للحشرات المعدية أو على الحشرات غير الحساسة. لقد أشارت عينات الاستكشاف إلى انتشار الباسيليليس كورستاكي عن طريق الخنافس (حتى ١٣٥ متر) وغيرها من الحشرات النشيطة على سطح التربة (بيدرسين وآخرين، ١٩٩٥). تغذية Bt بواسطة النمل المفترس (فورميكابوليكتينا) وبعدها يسمح للنمل بمص يرقات كريزوميل بوبيليا أدى إلى موت ٨٠-١٠٠% بينما عدم التغذية على Bt والعض أدى إلى موت ٧، ٦ - ٧، ١٦% فقط. لقد وجد أن نسبة عالية من الجثث الناتجة من التغذية على Bt والعض للضحايا احتوت على Bt حية وحيوية مما يوضح القابلية للتطوير من هذا الدخول المباشر لهيموسيل الحشرة (أوريكوف وآخرون، ١٩٧٨). من الممكن رؤية هذا التأثير مع معظم البكتيريا الملوثة سواء كانت ممرضة للحشرات أم لا.

أوضحت الدراسة التي أجراها شينج وآخرون، (١٩٨٣) نقل الباسيليليس جاليري بواسطة الأكاروسات المفترسة للحشرات القشرية في أشجار الصنوبر من كلية تانج في الصين. رش الباسيليليس على الأشجار المزروعة على مسافات متساوية في مكان به مفترسات يسبب النشر السريع جداً للبكتيريا ومن ثم يقلل من مجموع الحشرات القشرية. في دراسات معملية قام تميرك (١٩٨٢). بتلويث آلة وضع البيض في أنثى البراكون بريفيكورنيس بالباسيليليس قبل التطفل على دودة القصب الكبرى التي تصيب الذرة. لقد وجد حدوث انتشار سهل للبكتيريا Bt إلى الحشرات السليمة من ديدان القصب الكبرى في طور اليرقات من خلال وضع البيض كما وجد أن العوائل تحركت بسرعة أكثر بواسطة الطفيليات الملوثة عما هو الحال مع غير الملوثة وهذا ربما يكون راجعاً للفعل المشترك للبكتيريا وسم (فينوم) الطفيل. لقد وجد كوستاك (١٩٦٤) كذلك أن أشباه الطفيليات

نيميرينس كانسينس المعرضة للباسيلليس ثورينجينيميز تستطيع نقل Bt الى فراشة ايفسيتا كوهينيللا.

لقد اوضح استخدام الباسيلليس كورسناكى ضد آفات الحبوب المخزونة أن الحشرات غير الحساسة رايزوبيرثا ، ترابوليوم ، سيتوفيليس قامت بنقل الجراثيم الحية من القمح المعامل الى غير المعامل بحملها خارجيا أو إخراجها مع المواد الإخراجية الخاصة بها (Mc-Gaughcy وآخرون، ١٩٧٥). لاحظ Baur وآخرون (١٩٩٨-١) في دراسات حقلية أن النمل الأرجنتيني الذي يترمم على جنث الحشرات الميتة بواسطة الباسيلليس قد يساهم لحد كبير في نشر الباسيلليس كورسناكى (ديبيل) الذي يعدى ديدان الكرنب بشكل شائع وكذلك تغذية الزرزور تؤدي الى إخراج براز الطائر سامة لديدان الحرير (Fushimi وآخرون، ١٩٩٥)، في الماء يعتمد نشر الباسيلليس على حركة الماء وترسيب جراثيم وبلورات Bt لقد أجريت دراسة عن التوزيع المكاني والمؤقت لجراثيم الباسيلليس كورسناكى في أربعة مجارى مائية بعد الرش الجوى بمستحضر الثوروسيد لمكافحة بودة براعم الصنوبر في كوبييك. في هذه الدراسة حدث نشر للجراثيم بسرعة وتجانس على طول المجارى المائية (Dostie وآخرون ، ١٩٩٨). على العكس أشار undeen وآخرون (١٩٨١) أن الحركة مع التيار للباسيلليس الأسرائيلية كانت ضعيفة في الغالب. في ولاية نينسي وجد أن استخدام الباسيلليس Bt أسرائيلينسيز مع تيار الماء الجارى أظهر عدم الكشف عن البكتريا في الدوامات بالقرب من نقطة المعاملة بعد ٣٤ ، ٤٨ ساعة من المعاملة (فرون وآخرون ، ١٩٨١ - b).

فاعلية نشر Bt في مجاميع الحشرات تعتمد على ميكانيكية النشر. العدوى بواسطة التناول عن طريق الفم Oral ضعيفة عندما يكون توزيع الجراثيم والبلورات بالعوامل الطبيعية مثل المطر والرياح وفي التربة لأن التركيزات يحدث لها تخفيف مستمر لأقل من مستويات الجرعة التي تحدث العدوى. هذا بينما تكون العدوى كبيرة عندما تسمح الظروف بزيادة تركيز البكتريا كما يحدث في حالات الرش - التغذية والعدوى في البراز لآكلات الحشرات والجنث المعدية. حدوث الجروح بواسطة عض المفترسات ووضع البيض في أشباه الطفيليات تنشر الباسيلليس بكفاءة لأنها تمر من خلال الحواجز الموجودة في جدار المعدة وتوصل البكتريا مباشرة الى أنسجة الجسم المناسبة للعدوى. عن هذا الطريق تكون الجرعات المحدثة للعدوى صغيرة جدا. نشر عدوى Bt يعرف فقط من خلال التجارب التي تستهدف تسجيل موت الحشرات عن طريق ملاحظة الجراثيم سواء بالعين المجردة أو بأطباق الاختبار البكتيري ولكنها لا تؤكد على وجود الباسيلليس بمستويات معدية.

ثالثاً: دور وفاعلية خلط الباسيلليس مع المبيدات الحشرية الأخرى:

المبيدات الحشرية المحتوية على الباسيلليس Bt تستخدم أحياناً في خلائط مع المبيدات والوسائل التي تستخدم في إبادة الحشرات مثل الممرضات أو الكيمياءات أو في المواقف التي يستحب وجود نشاط وفاعلية باقية للمواد التي سبق إستخدامها. لذلك أصبح من الأهمية فهم التداخلات المؤثرة عند التوصية بالاعتماد على Bt كمبيد حيوي ذات أمان بيئي. تحديد وقياس أو الكشف عن تأثيرات الخلط ليس من الأمر السهل بسبب ندرة حدوث استجابات تشيطية وغالباً ما يصطدم التنشيط بالتأثيرات الإضافية حتى على مستوى المعمل. لقد تناولت القليل من الدراسات إلقاء الضوء عن تأثيرات استخدام الباسيلليس Bt مع المبيدات أو الممرضات ضد الحشرات غير المستهدفة. هذا أدى الى الحاجة باستقراء ما يحدث مع دراسات التأثيرات على أنواع الآفات. في الغالب تتفاوت الاستجابات مع الجرعة حيث قد نجد تأثير تشيطي أو إضافي مع جرعة واحدة بينما قد تكون الاستجابة تضادية مع جرعة مختلفة. بوجه عام وجد أن المبيدات الكيميائية حفزت أو زادت من فاعلية الباسيلليس Bt ولو أن هناك بعض الاستثناءات. تداخلات الباسيلليس مع الممرضات تتفاوت ومن النادر أن تكون تشيطية حيث أن Bt تتنافس مع الممرضات الأخرى في الحصول على المواد الطبيعية التي تقدمها العوائل الحشرية.

التداخلات مع الممرضات Interactions with pathogens

الميكروبات المرضية على الحشرات (مثل النيماتودا الممرضة للحشرات entomopathogenic) تحدث طبيعياً في مجموع الحشرات وقد تستخدم كوسائل لمكافحة الحيوية. حيث أن الممرضات تحدث في كلا مجاميع الحشرات أو مجاميع خالية من الآفات فإن تداخلاتها مع الباسيلليس Bt هامة في تقديم التأثير البيئي للباسيلليس. بسبب أن الممرضات تتنافس مع Bt على العوائل فإنه من المتوقع أن التأثيرات قد تكون أقل من الإضافية أو حتى تضادية antagonistic. لقد تم تدوين ما حصلت عليه من تقارير استخدام النيماتودا والبروتوزوا والفيروسات والفطريات مع استخدامات الباسيلليس في جدول (٣-٤). بوجه عام فإن التداخلات تمثل ناحية التضاد البسيط بينما أشارت بعض التقارير القليلة الى تداخلات أكثر إيجابية بما فيها التنشيط الممكن والمحتمل.

النيماتودا المرضية للحشرات من أنواع Heterorhabditis و Steinernema

استخدمت مع البيتا - أكسوتوكسين باسيلليس كورسيكي ، ايزاويا ، ثورينجنيسيز . عندما استخدمت ضد الجعال في التربة أظهرت النتائج تأثيرات إضافية أو أفضل (كوبنهوفر

وكايسا، ١٩٩٧) بينما كانت التأثيرات على حشرات حرشفية الأجنحة سالبة (جدول ٣-٤) بسبب التأثير المقارن الكبير للباسبيليس على يرقات حرشفية الأجنحة في منطقة الفيلوسفير. حجبت التأثير القليل نسبيا للنيماتودا في مكان المعيشة هذا. أظهر أحد الاختبارات على أنواع حشرات ذات الجناحين (تبيولا بالودوسا) والبيتا - أكسوتوكسين حدوث تداخل تنشيطي (لام دويستر، ١٩٧٢). استخدام الباسبيليس Bt والنيماتودا المرضية للحشرات S.Feltiae أظهر تداخل تضادى في مكافحة الدودة القارضة حيث أن الجثث لم تعضد تكاثر النيماتودا.

حشرات حرشفية الأجنحة غالبا تعاني من فيروسات البولهيديروزييس النووية (NPV's) وقد استخدمت هذه الفيروسات كوسائل مكافحة حيوية لسنوات عديدة. التقارير الخاصة باستخدام الباسبيليس كورستاكي مع فيروس NPV's ضد حشرات حرشفية الأجنحة متضاربة حتى مع نفس العائل. مثال ذلك ما وجدته Luttrell وآخرون (١٩٨٢) من أن تأثير الفيروس NPV مع الباسبيليس كورستاكي على دودة اللوز الأمريكية التي تتغذى على القطن كانت أقل من إضافية بينما وجد الباحثان بيل ورومين (١٩٨٠) أن تأثير كورستاكي NPV/Bt على نفس العائل على القطن كانت إضافية. عدم التوافق بين NPV والباسبيليس Bt سجل مع العديد من حشرات حرشفية الأجنحة وقد ترجع إلى إيقاف التغذية المقسبب عن الباسبيليس والتي تمنع تناول الفيروس (Navon، ١٩٩٣). في بعض الأحيان يكون تأثير الفيروس NPV ضد حشرات حرشفية الأجنحة إضافي كما حدث عندما استخدم مخلوط الباسبيليس والفيروس (AC NPV) ضد دودة اللوز الأمريكية (بيل ورومين، ١٩٨٠). الكميات غير القائلة من الباسبيليس كورستاكي (نصف المعدل الحقلى للديبيل قابل للبلل) مع أقل جرعة من الفيروس NPV (٣ × ١٠^{١١} أجسام البولى هيدرال (PIB) / هكتار بالمقارنة بأعلى جرعة ١ × ١٠^{١٢} PIB / هكتار) كانت أفضل مما هو الحال مع استخدام المادة أو الوسيلة منفردة في مكافحة آفة الكرنب ترايكوبلوزيا فى (تومبكنيز وآخرون ، ١٩٨٦) وهذا قد يرجع لأن الجرعات غير القائلة لا تقلل من التغذية (نافون، ١٩٩٣). لقد كان تأثير البولهيديروسيرو فيروس السيتوبلازمى (CPV) والباسبيليس ضد حشرة الصنوبر D. spectabilis إضافيا أو عاليا بعد التطبيق الميداني. عندما استخدم الباسبيليس Bt (ثوروسيد أو ديبيل) مع الفيروس الحبيبي granulosus لحشرة Z. diniana حدث تأثير مضاد للفيروس (Schmid، ١٩٧٥). على عكس هذه النتيجة لوحظ تأثير تنشيطي عندما استعملت الباسبيليس على اليرقات المعدية فعلا بالفيروس مما يوضح أن مدى الاستجابة الممكنة يعتمد على ظروف التجريب ووقت

المعاملة ... الخ تنشيط الفيروسات الحشرية المتأخرة يمكن من خلال معاملات الباسيلليس. لقد أشار Manshev ، (١٩٨٠) زيادة نسبة موت يرقات الحرير بواسطة الفيروس بمقدار ٦، ١٣% بعد المعاملة بالجرعات غير المميتة من الديبيل حيث أن يرقات دودة الحرير غير المعاملة سجلت موت بواسطة الإصابة الفيروسية مقداره ٧، ١%.

من أكثر أنواع الفطريات الممرضة للحشرات الشائعة الاستخدام البوفاريا باسيانا، *Metarhizium anisopliae*. لقد أعطت هذه الأنواع الفطرية نتائج متفاوتة مع الباسيلليس كورستاكي عند الخلط. خلط البوفاريا مع Bt أظهرت تأثير تضادى مع دودة ورق القطن في المعمل بينما كان الفعل استقلالي independent (إضافي ؟) على ثاقبة الذرة أوسترينيا نوبيلاليس (لويس وبنج، ١٩٩١). لقد استخدمت التوكسينات من النوع الفطري *M. anisopliae* فقط مخلوط مع الباسيلليس كورستاكي وكانت التوكسينات منشطة مع الجرعات الواطية (Brouseau وآخرون، ١٩٩٨). الممرضات البروتوزوية الميكروسبوريدية مثل النوزيما بيروستا، الفيريمورفا نيكتريكس أظهرت تداخلات مابين التضاد وحتى التنشيط مع الباسيلليس ضد حشرات حرشفية الأجنحة (جدول ٣-٤). العدوى ببكتريا Bt قللت من كفاءة العدوى بالبروتوزوا الممرضة للحشرات "النوزيما" ضد حشرة حرشفية الأجنحة *L. albicosta* عن طريق جعل الخلايا الطلائية تحجم وتخفى جراثيم الميكروسبوريديا والخلايا الخضرية في جدار المعدة (هلميز وودبرج، ١٩٧٦).

التداخلات مع المبيدات الكيميائية Interaction with pesticides

استخدام خلط المبيدات الكيميائية والباسيلليس Bt أدى الى حدوث زيادة معنوية مؤكدة في الفاعلية ضد الآفات المستهدفة وكانت معظم الاستجابات تتراوح من التأثير الإضافي أو التنشيطي (جدول ٣-٥). لقد استعرض Benz ، (١٩٧١) الدراسات الخاصة بالتداخلات بين الكائنات الدقيقة والمبيدات الحشرية الكيميائية. في السبعينات أشارت العديد من الدراسات أن الجرعات غير المميتة من المبيدات الحشرية ذات تأثير إضافي أو تنشيطي مع الباسيلليس (Morris، ١٩٧٢). هذا ولو أن التقارير عن تأثيرات الخلط في المراجع تشير الى نتائج متفاوتة ومختلفة. مثال ذلك أن تأثير منظم النمو الحشري "مانع الانسلاخ" المسمى دايفلوبنزيرون مع الباسيلليس تراوح من تضادى عندما استخدم ضد دودة اللوز الأمريكية (محمد وآخرون ، ١٩٨٣) وحتى التنشيط ضد دودة ورق القطن (زاد وتريشنايا ، ١٩٩٦). في الاتحاد السوفيتي السابق استخدمت مخاليط من مستحضرات الباسيلليس مثل Gomelin أو دندروباسيلير مع الديميلين ضد يرقات حشرات مختلفة وقد

تحصل على نسبة موت ١٠٠% في اليرقات الصغيرة مع الجرعات الواطية عما هو الحال عندما استخدمت منفردة (Grigoryan وآخرون ، ١٩٨٨) البيرثرموز عادة ذات تأثير تنشيطي أما مانعات الانسلاخ أو الكيتينيزس تحدث عدم تأثير أو حتى تنشيط ضد أنواع الحشرات المختلفة. أظهرت القليل من الدراسات أن استخدام مخاليط ضد الحشرات غير حرشفية الأجنحة تعطى تأثيرات تتراوح من إضافي الى تنشيطي وهذا واقع من خلط المبيدات مع الباسيليليس أسرائيلينسيس في الماء. لقد تحصل على نفس التأثيرات مع الباسيليليس كورستاكي والثورينجينسيس ضد حشرات tenebrionidae .

لقد أظهرت العديد من الدراسات الحقلية أن استخدام خلائط المبيدات الكيميائية والباسيليليس أدت الى حدوث تأثيرات عالية على المفترسات غير المستهدفة والطفيليات عما هو الحال مع استخدام Bt منفردة (كينيدى وأوتمان، ١٩٧٦، موريس وأرمسترونج، ١٩٧٥). بينما لم تكن هذه النتائج متوقعة فإن هناك حاجة إلى دراسات مستقبلية.

الباب الرابع

المبيد الحيوي باسيلليس تورينجينسيز واستخداماته في الدول النامية

مقدمة : لست في حاجة للقول بأنه في العديد من دول العالم تعتمد وقاية النباتات بشكل أساسي و كثيف على المبيدات. بالرغم من أن هذه المبيدات تحقق فاعلية جيدة في مكافحة الآفات إلا إنها سببت ومازالت تسبب العديد من المشاكل الخطيرة : إضرار صحية على الإنسان و الحيوان، تحطيم وسائل مكافحة الطبيعة، زيادة مقاومة الأنواع الرئيسية من الآفات الحشرية و ما يستدعي ذلك من زيادة تدريجية في الجرعات المطلوبة لمكافحتها. على الرغم من تضاعف كميات المبيدات الحشرية عشرة مرات منذ الأربعينيات إلا أن الفقد المحصولي تضاعف أيضا مرتان خلال نفس الفترة. لقد ادي ذلك الى المناداة بضرورة ايجاد طرق ووسائل أخرى لمكافحة الآفات جنبا الى جنب مع المبيدات و ليست بديلا لها و قد كان الصوت الغالب يتمثل في تعظيم مجهودات الحصول على المبيدات أو التجهيزات الميكروبية. لقد تأكد ان الوسيلة الميكروبية التي تحقق الاهداف المرجوة هي بكتريا الباسيلليس تورينجينسيز أو المايسترو الرائد كما اثرت ان اسمها كعنوان لهذا الكتاب و التي تختصر الى BT. لقد اثبت هذا الكائن الحي الدقيق انه سلاح فعال وفتاك وناجح في مجابهة بعض الآفات الزراعية و بعض ناقلات الامراض. مع هذا فان استخداماته مازالت محدودة في الدول النامية باستثناء الصين التي تنتج بشكل واسع وتستخدمه على نطاق كبير ايضا. البكتريا هذه ليست سامة للإنسان و معظم الحشرات الاخرى غير المستهدفة و البيئة بشمول اكبر. هذه البكتريا تستهدف افات معينة. امان هذه البكتريا يرتبط بانخفاض تكاليف الحصول عليها وتطويرها وكذلك صغر تكاليف التسجيل مقارنة بالمبيدات التقليدية. من حسن الطالع انه قد عقدت ورشة عمل دولية عن بكتريا الباسيلليس تورينجينسيز BT واستخداماتها في الدول النامية في الفترة من ٤-٦ نوفمبر ١٩٩١ في المركز القومي للبحوث في مصر و صدر كتيب الورشة عام ١٩٩٣. لقد عقد المؤتمر بالتعاون و المشاركة بين المركز القومي للبحوث في مصر و المركز القومي لتطوير البحوث IDRC في اوتساوا ووزارة الزراعة الكندية - وينيبيج - مانيتوبا. لقد تمثلت اهداف ورشة العمل في النقاط التالية:

- ١- تعريف التحديات التي تجابه استخدام بكتريا BT في الدول النامية.
- ٢- مناقشة احدث الدراسات و البحوث التي ترتبط بالدول النامية.
- ٣- تعريف الحاجة و اولويات زيادة استخدام بكتريا BT في الدول النامية.

١- تطوير عزلات باسيليس تورينجينسيز والميكروبات الهوائية المشابهة للاستخدام في الدول النامية.

من مقالة للدكتور H.T. Dulmage في Brownsville - تكساس انذاك لقد حدث تطور كبير في الحصول على عزلات افضل من باسيليس تورينجينسيز (B.T.) في مكافحة حشرات الترايكوبلوزياتي ودودة اللوز الامريكية. لقد وجد ان المستحضرات الابتدائية من HD-1 كانت اكثر فاعلية بمقدار ١٠٠ مرة عن المنتجات التجارية التي كانت موجودة في ذلك الوقت. منذ ذلك التاريخ زاد انتاج توكسينات الباسيليس بمقدار ١٠٠ ضعف في حضانات التخمر. لسوء الحظ عكست الزيادة الكبيرة في الانتاج مدي ضعف المستحضرات الاصلية. حتي مع هذه الزيادة فان المستحضرات الجديدة لم تكن فعالة او اقتصادية بما يكفي للاستخدام الواسع في مكافحة الافات الحشرية في الغابات. لقد ادي التعقيد من جانب كيميائي المستحضرات ومهندس التطبيق الى تحقيق الحصول على منتجات وطرق تطبيق جعلت من السم الداخلي المسمى HD-1 endotoxin فعال بشكل اقتصادي في مكافحة افات الغابات الحشرية. لقد تاكدت امكانية التحسين الكبير في مستحضرات ممرضات الحشرات ولو ان ذلك يستغرق وقتا ومجهودا كبيرا الا ان التحسين ممكن ومؤكد. هذا من المفاهيم العامة ولكنة ينسي بشكل متكرر وملحوظ. بالرغم من وضوح الرؤية اشار كاتب المقال باننا مازلنا في المراحل المبكرة والاولى من المعرفة حول هذه الممرضات للحشرات او توكسيناتها والتي يمكننا تحقيق تحسينات ملحوظة في الفاعلية والانتاج والمستحضرات وطرق التطبيق فان العديد من العلماء يميلون بشكل قوي شأنهم شأن مسئولى الادارات الذين يدبرون النفقات والميزانيات ويعتقدون بان ما نحن فيه الان يمثل الوضع الافضل في هذا المجال. العديد من تقسيمات الممرضات الحشرية مقيدة باحكام مبنية على المعرفة الحالية وحتى هذه لا تسمح بامكانية التحسين في السلالات او الطرق. لابد وان هناك عزلات افضل اذا استمرينا في البحث عنها. هناك طرق تخمر وطرق شفاء واسترجاع افضل اذا نحن دخلنا في مجال البحث عن نظم افضل للتخمر. هناك طرق افضل لاستخدام هذه الممرضات و التوكسينات اذا تمكنا من تحقيق تعاون وثيق بين رجالات الحشرات والميكروبيولوجي والكيمياء والهندسة الصناعية ما يؤدي الى تحقيق الاهداف المرجوة من هذه التكنولوجيا الجديدة.

١- أساسيات التخمر: على امتداد السنوات القليلة الماضية احدث نجاح استخدام عزلات الباسيليس تورينجينسيز (Bt) في مكافحة العديد من الافات الحشرية الزراعية و تلك

التي تستهدف حتى الحصول على طرق تخمر أكثر كفاءة. لقد ثبت الفاعلية العالية لعزلتين من هذا الجنس ضد الحشرات ذات الأهمية الاقتصادية الكبيرة وهما: B.t. تحت النوع كورسناكي الفعالة ضد حشرات حرشفية الأجنحة و Bt تحت النوع اسرانييلينسيز الفعالة ضد البعوض و الذباب الاسود. لقد حدث تباطؤ في هذا التطور بسبب الفهم غير الكامل عن ماهية بكتريا B.t وماذا يمكن ان تعمله وما لا يمكن ان تعمله ولماذا ؟ لقد ادي هذا الاعتقاد لدى كاتب هذا المقال انه يمكن القيام بالاسهام في استعراض الاسس الخاصة باساسيات التخمر مع توضيح امكانية تطابق هذه الاسس على كل انواع التخمر سواء كانت بكتيرية أو فطرية أو اكتينوميستيس. سوف نتناول ما احدثته عمليات التخمر نحونا في الماضي وماذا ننتظر ونتوقع منها في المستقبل مع مناقشة مدي ارتباط انتاج Bt مع دراسات هذا الملتقى.

١-١ تاريخ التخمر : في الايام الاولى من بحوث التخمر كانت تعزي اية فاعلية ابادية ضد الحشرات في التخمر الميكروبي الى التنافس من اجل الغذاء حيث يشير النمو البطيء للميكروب الى خسارته المعركة. لسوء الحظ فان العدوي تلعب دورا قليلا أو لا تلعب دور في معظم الانشطة الميكروبية الابادية والفشل في تحديد هذا المفهوم يؤخر العديد من الاكتشافات. مثال ذلك ما حدث من قيام العلماء لسنوات عديدة بالاعلان بان الفطر بنسيليوم نوتاتم (ملوث شائع لاطباق الاجار) عندما ينمو في مزرعة مختلطة مع البكتريا الموجبة لجرام فانها تقتل البكتريا عن طريق منافستها في الحصول على الغذاء المتوفر. لقد ثبت ان هذا الاعتقاد خاطيء: لقد كان البنسيليوم نوتاتم فعالا ونشيطا بسبب انتاجه لسم كيميائي وهو البنسيلين penicillin الفشل في تمييز الاختلاف بين فاعلية التوكسين (المضاد الحيوي antibiotic) أو الانتاج الفعال للتوكسين وعدم الفاعلية اخرت استخدام هذه الوسيلة العلاجية الفعالة لمدة طالت ٤٠-٥٠ عاما. كنوع من الاهتمام و الاثارة توجهت الجهود نحو معرفة وااثبات فاعلية مثل هذا الفطر والفطريات المشابهة بسبب انتاج المضاد الحيوي بدرجة تفوق مجرد العدوي مما ادي الى حصول العالم فليمينج و معاونوه على جائزة نوبل. بعد وقت قصير من انجاز فليمينج تم الكشف عن المضاد الحيوي "ستربتومايسين بواسطة الباحث واكسمان. الاستربتومايسين الذي ينتج بواسطة ستربتومايسين جريسيوس كان من اول الوسائل التي تعالج بشكل حقيقي السل الرئوي tuberculosis وقد حصل واكسمان على جائزة نوبل عن هذا

الاكتشاف. لقد فتح هذا الكشف المجال لامكانية انتاج العديد من المواد النشطة حيويًا من عمليات التخمير. منذ ذلك الحين تم اثبات ان مئات الميكروبات المختلفة تنتج مدي واسع من المواد الحيوية. لقد تاكد بشكل معنوي ان هذه المواد الناتجة عبارة عن كيميائيات معقدة غالبًا لا ترتبط مع بعضها البعض، وقد وجد ان الانواع العديدة من الميكروبات مثل الفطريات والبكتريا والاكثينومايستيس تعتبر من المصادر للكيميائيات الحيوية الفعالة التي تتميز بانها تراكيب جزيئية معقدة مما يجعل تخليقها مكلف للغاية ومن ثم تنتج عادة بتكاليف اقتصادية.

هذه ليست نهاية القصة حيث انه بمجرد التأكد من ان منتجات التخمير ذات أنشطة حيوية مفيدة بدأت العديد من المعامل في كل انحاء العالم في فحص تخمير البيرة وما اذا كان ينتج مركبات اخري وقد كانت النتائج مذهلة. في الوقت الحالي تستخدم الكثير من نواتج التخمير في مكافحة انواع عديدة من الميكروبات المرضية. تفيد هذه النواتج في تخليق الاستيرويدات وهي تلعب دورا مهما في نظم علاج للسرطان كيميائيا (اكثينومايسين - دي) ربما يكون من الاستخدامات غير المتوقعة استغلالها في منع رفض الجسم للعضو المزروع (مثل سيكلوسبورين). كذلك تستخدم هذه المنتجات في مكافحة العديد من الناقلات الحشرية لمسببات الامراض حول العالم. لقد تاكد ان عزلات عديدة من الباسيلليس تنتج مواد تبديد الحشرات تفيد في مكافحة الحشرات التي تصيب الزراعات المختلفة (H-14, HD-1).

٢-١ التخميرات المغسورة Submerged Fermentations

اذا تكلمنا عن الاساسيات لهذه العمليات نقول ان تخمرات Bt تحتاج لمستويات عالية من الكربون والنيتروجين والاكسجين. بداية فان الميكروبات الهوائية مثل B.t. تحتاج للهواء بشكل كبير في المراحل الاولى من التخمير في الغالب يكون من المستحيل تشبيع مزارع نمو B.t. بالهواء في المرحلة اللوغاريتمية في مخمر سعة ١٤ لتر حتي مع معدل تهوية ٢ مجم/ متر . المستويات العالية من الكربوهيدرات المطلوبة في تخمر بكتريا Bt عادة تزود من الدكستروز والنشا. حيث ان الكربوهيدرات تستطيع انتاج كميات كبيرة من الاحماض العضوية والتي تخفض من رقم حموضة التخمير الى ٥,٢ - ٥,١ و هي الدرجة التي لا نستطيع الباسيلليس النمو فيها ومن ثم تقف عملية التخمير. (معادلة هذه الحالة تسمح للميكروب بالنمو). المستويات العالية من النيتروجين ومن نفايات البروتينات ونواتج التحلل المائي أو

منقوع الذرة) ينشط النمو وفي هذه الحالة يفرد قواعد عضوية. لذلك فان التوازن بين النيتروجين والاكسجين يؤثر بشكل واضح على درجة الحموضة خلال عمليات التخمر. ضبط الحموضة في التخمر (من ٥,٤ - ٨,٤) يمكن تحقيقها من خلال الاختيار الصحيح للمواد المغذية والتوازن الحامضي من الكربوهيدرات والقواعد من البروتينات. في النهاية فان توازن الاملاح المعدنية مطلوب كذلك. البيئة النموذجية موجودة في جدول (١-٤).

جدول (١-٤) : بيئة التخمر B- 4b

| | |
|---------------------------------------|--------------|
| Proflo | 20.0 g/liter |
| Peptone | 2.0 |
| Dextrose | 15.0 |
| Yeast Extract | 2.0 |
| CaCO ₃ | 1.0 |
| MgSO ₄ . 7H ₂ O | 0.3 |
| FeSO ₄ . 7H ₂ O | 0.02 |
| ZnSO ₄ 7H ₂ O | 0.02 |
| Distilled H ₂ O to 1000 ml | |

إذا تكلمنا عن الاختلافات الفلسفية بين طرق التقييم الحيوي للمبيدات الكيميائية والحيوية نقول ان علماء تقييم كفاءة المبيدات الحشرية دخلوا عالما جديدا مع ظهور المبيدات الميكروبية. في حالة المبيدات الحشرية الكيميائية يكون القائم بالتحليل على دراية كافية بكمية ونقاوة المبيد تحت الاختبار. التحليل ليس عملية اضافية لعملية الانتاج ولكنه مطلوب فقط للتأكد من المواصفات . في حالة المواد الميكروبية مثل Bt فان التحليل يجب ان يستكشف كل مراحل عملية الانتاج مثل: جودة عملية التخمر ، ما هو نوع الفقد الذي يحدث للفاعلية خلال استرجاع المادة الفعالة من وحدة التخمر، جودة المنتج المسترجع وخصائص المستحضر النهائي. كل هذه الاعتبارات والمحددات يجب ان تعرف وبدقة وجميعها يمكن التحقق منها عن طريق التقييم الحيوي. التقييم الحيوي ليس هامشيا او كماليا لهذه العملية الخاصة بالحصول على بكتريا Bt ولكنه عامل محوري. لذلك فان العقلانية والدقة المطلوبة للتقييم الحيوي للمبيدات الحشرية الميكروبية اكثر كثيرا من تلك المطلوبة مع المبيدات الكيميائية (Dulmage ١٩٩٠). عمليات الاسترجاع للمبيد الحشري الكيميائي عادة تجري مع تركيز عالي من المركب بينما اجراء هذه العملية مع

المبيد الميكروبي مثل HD-1 يبدأ في العادة مع تركيز منخفض (١٠ ميكروجرام مركب/لتر أو أقل) وهي عملية شاقة.

٢- الباسيلليس تورينجينسيس : اذا تكلمنا عن الاكتشاف و التقسيم لبكتريا B.t. نقول ان Bt لوحظت في البداية بواسطة الباحث Ishiwata حيث وجدها في مزرعة ديدان الحرير المريضة أو الميتة في اليابان عام ١٩٠١. لقد كان الوصف الذي قدمه ايشيوانتا كافيا بما يجعلنا نميز انه قد قام بعزل B.t. الا ان التسمية لم تكن مناسبة حيث تركت للباحث Berliner عام ١٩١١ كي يسمي عزله *Bacillus thuringiensis* رجوعا الى ولاية Thuringia الالمانية حيث وجدها. من الواضح ان B.t. تتوزع بشكل عريض في التربة ومن ثم توجد فيها بشكل متكرر وعلى حد علمي فانه لم يتمكن احد من عزل B.t. من أي حشرة ضارة فيما عدا مكان المعامل حيث كانت تنمو الباسيلليس في الماضي. لقد حدث تضارب بين العلماء وعدم اتفاق عن عزلات Bt في بداية العمل خاصة فيما يتعلق بتمييز الانواع المختلفة من Bt التي وجدت في المعامل المختلفة. في عام ١٩٥٨ اثار الباحثان Bonnefoi and Barjac ان الفصل تقسيم العزلات Bt يبنى على التفاعلات الانتيجينية للاسواط المرتبطة بالخلايا الصغيرة والنشطة الحركة للباسيلليس.

التسمية تبعا لمقترح بونيفوي وبارجاك مباشرة ولا لبس فيها حيث يمكن من خلال هذا النظام تقسيم العزلات المختلفة الى مجاميع ومع كل مجموعة خصائصها الانتيجينية المميزة. بناء على هذه الخصائص فان المزارع تأخذ اعداد H-number (ايضا يطلق عليها طرز سيرولوجي أو تحت النوع) والتي توضع في رتبة تتابع أو في مجموعة من عزلات اخري. لقد وجدت علاقة وارتباط واضح بين انواع H-types و النشاط الابادي ضد الحشرات. من الصعوبة رؤية علاقة بين انتيجين السوط للخلية الخضرية من Bt وتوكسين الابداء الذي تنتجه الخلايا عندما تتجرثم واذا وجد الارتباط يكون غير كامل كما سنري فيما بعد. الطرز السيرولوجية نظام بسيط سهل الاستخدام وطريقة الحصول عليها مقبولة لتقسيم عزلات الباسيلليس Bt المختلفة. لذلك فان مكتشف أي عزلة جديدة عنده ميزة تسمية اكتشافه. من العزلات الهامة ثلاثة من بين ٣٥ عزلة معروفة نذكرها في هذا المقام:

| | | |
|---------|---------------|------------------|
| H-3a,3b | Kurstaki HD-1 | (Dulmage, 1967) |
| H-7 | Aizawai | (Aizawai, 1962) |
| H-14 | Israelensis | (Goldberg, 1980) |

مناقشة دور الجرثومة في تخمرات Bt تشير الى ان الجرثومة عند افضل الحالات تعتبر عامل ثانوي في قتل الحشرات. النشاط الابادي على الحشرات لعزلات B.t. والمستحضرات ترتبط بالتوكسينات البلورية والبروتينية التي تنتج بواسطة خلايا B.t. وتسمى الدلتا - اندوتوكسين. كما هو معلوم فان الجراثيم والبلورات لا تنتج بالتوازي ولا يرتبط كلاهما بالآخر أو بالفعل السام. لم يكن ذلك معروفا لسنوات عديدة وكل ما كان يجري في البحوث عن Bt من قبل كان يعتمد على عد الجراثيم لتقييم نتائج الدراسة. في الواقع والحقيقة فان الوكالات التشريعية في امريكا تتطلب وتشرط ان تكون المستحضرات التجارية للباسبيليس B.t. قياسية المواصفات عن طريق محتوى وعد الجراثيم كما تشرط ان توضح البطاقة توضيحا بان الكفاءة معبر عنها بعدد جراثيم B.t. يكون خلال التقييم الحيوي. عد الجراثيم يعطي تقدير جيد وعقلاني لنمو الباسبيليس في المستحضر الاصلي. لسوء الحظ فان الاعتماد على عد الجراثيم لقياس كفاءة التجهيز يعتبر منافي للصواب لسببين بعيدا عن عدم الدقة في عد الجراثيم وهما:

- أ- لا يوجد سبيل لتجهيز تحت الانواع مع عد الجراثيم.
- ب- لا يمكن الحصول على أي معلومة عن عنف العزلة أو ضعفها من خلال عد الجراثيم. عد الجراثيم تعتبر وسيلة مفيدة في تتبع نمو بكتريا Bt في العينات من وحدات التخمر أو التجزئة و الفصل خلال دراسات الاسترجاع. الجدول ٤-٢ ، ٤-٣ توضح المشاكل التي تنجم مع عد الجراثيم حيث الجدول (٤-٢) يقارن بين عدد الجراثيم مع الكفاءة في الوحدات الدولية (IU) International units لثمانية عزلات Bt نامية في بيئة متماثلة. عد الجراثيم المقدر مع ٧ من هذه العزلات يختلف في مدى ضيق (٦-٧ x ١٠^٦ جراثيم حية /جم) ولا ترتبط كلاهما مع الآخر. على نفس المنوال فان الكفاءة المقاسة في التقييم الحيوي في مقابل أو ضد دودة اللوز الامريكية تتراوح من صفر وحتى ٧٠٦٠٠ وحدة دولية/مللجم مع عدم وجود دليل على ارتباط بين الجراثيم والبلورات. العزلتان HD 244, HD263 تنتج مستحضرات اكثر فاعلية عن باقي العزلات. الجدول يشير الى بعض التحيز بوضع و تضمين العزلات HD 519, HD 563 ضمن العد العالي للجراثيم حيث ان كلا المزرعتان طرز سيرولوجية H-14 (تحت النوع اسرانييلينسيز). عزلات H-14 تنتج توكسين ذات وزن جزيئي منخفض و أنشطة سامة مختلفة وسم دلتا- اندوتوكسين متميز ذات

فاعلية قليلة أو بدون فاعلية أو كفاءة عالية ضد البعوض. هناك شك فيما إذا كان H-

14 تقسم كنوع جديد.

جدول (٤-٢): السدائل بين عد الجراثيم ونشاط العزلات المختلفة من الباسيلليس تورينجيسيز.

| Activity vs. | | | | |
|--------------|----------|-----------------------------------|----------------------|----------------------------|
| Culture No. | Serovar. | Spore count X 10 ⁹ / G | H. virescens (Kiu/G) | KIU/10 ⁹ Spores |
| HD-2 | H-1 | 12 | 1.410 | 120 |
| HD-83 | H-3A | 6 | Inactive | 0 |
| HD-1 | H-3A,3B | 17 | 15.400 | 910 |
| HD-263 | H-3A,3B | 11 | 54.600 | 4.210 |
| HD-244 | H-3A,3B | 13 | 70.600 | 5.400 |
| HD-305 | | 16 | 943 | 59 |
| HD-519 | | 63 | Inactive | 0 |
| HD-563 | | 62 | Inactive | 0 |

ملحوظة: المناقشات المذكورة في هذه المقالة مأخوذة و مشتقة من ورش العمل التي عقدت في الدول المختلفة بداية من عام ١٩٧٧ وحتى السبعينات وسوف اضعها بالانجليزية كما هي

*N.B. The following discussions are derived from a series of workshops conducted in the country and year indicated: New Zealand (1977); Italy (1979; 1980); Japan (1980); USA (1980); Israel (1988); Brazil (1988; 1990). In addition, a series of unpublished workshops were conducted in Egypt (1980); China (1982; 1988); England (1985); and the philippines (1987).

جدول (٤-٣): الارتباط بين عد الجراثيم و الفاعلية لنفس المزرعة النامية في بيئات مختلفة.

| Activity vs. | | | | |
|--------------|--------|------------------------------------|-----------------------|----------------------------|
| Culture No. | Medium | Spore count X 10 ⁹ / ML | H. virescens (Kiu/ML) | KIU/10 ⁹ Spores |
| HD-263 | A | 1.2 | 5.800 | 4.830 |
| | B | 1.7 | 12.100 | 7.120 |
| | C | 2.4 | 3.830 | 1.600 |

إذا تكلمنا عن خصائص بكتريا B.t. نقول ان Bt تماثل B.cereus كائن شائع في التربة في الحجم والشكل والسلوك مع استثناء ان ذات اهمية كبيرة في نفس الوقت الذي تستجر ثم فيه خلايا B.t. تظهر في الخلايا الاجسام الجرثومية والتي تكون بللورية الشكل في العادة. هذا من اكبر خصائص هذه المجموعة من البكتريا الباسيلليس والتي يشيع الاشارة اليها بالبكتريا البللورية Crystalliferous.bacteria الاجسام الجرثومية parasporal يشار اليها بشكل غير دقيق أو مرن "بلورات Crystals" أو التوكسينات البللورية crystalline toxins والتي نوقشت على انها "دلنا اندوتوكسينات - delta endotoxins" ان وجود أو غياب البللورة لا يستخدم كمعيار مطلق أو منفرد للتعريف والتمييز بين Bt, B-cereus خاصة خلال دراسات التخمر. ان حظر النظر الفاحص الشديد للباسيلليس Bt غير البللوري يجب استبعاده. ولو ان هذا قد لا يكون دقيق دائما فان التقسيم الاولي للمزارع يتوافق مع معايير B.cereus بشكل مباشر ومستقيم. اذا تم الكشف عن وجود الاجسام البللورية يطلق على الباسيلليس B.t. واذا لم توجد يطلق على البكتريا B-cereus.

العديد ان لم يكن الجميع للبلورات الناتجة بواسطة بكتريا Bt سامة لواحد أو اكثر من الانواع الحشرية. مرة واحدة ساد الاعتقاد ان كل هذه التوكسينات البللورية فعالة ضد الحشرات وحديثا اتضح ان عزلات عديدة تماثل Bt في احتوائها على بلورات ولكنها بدون اية تأثيرات ابادية على الحشرات. هذه التوكسينات البللورية كمجموعة تسمى "دلنا - اندوتوكسينات" تبعا للنظام الذي وضعه Heimpeل عام ١٩٦٦. هذا اسم عام وليس متخصص لوجود العديد من الدلتا-اندوتوكسينات الناتجة بواسطة عزلات مختلفة من بكتريا B.t. من الاهمية بمكان التمييز و المعرفة انه لا يوجد واحد فقط B.t. أو واحد فقط من Bt دلنا-اندوتوكسين.

انواع Bt تتكون من مجموعات من الميكروبات لكل منها خصائصه الخاصة به. بداية فان النوع يقسم الى تحت انواع أو طرز سيرولوجية تبعا للتفاعلات السيرولوجية للمسوط الشبيهة بالخيط كما وصف قبلا. كل تحت الانواع هذه تعطي اسماء متميزة. تحت نوع Bt المسمى كورستاكي، جاليري، ايزاواي، موريسوني، تينييريونيس، اسرانييلينسيز، ساندييجو تمثل مجموعة من الاسماء المعروفة الان. يوجد حاليا ما يزيد عن ٣٥ تحت نوع من Bt بالاضافة الى الاسماء أو الاقسام التي توضع باستخدام الانتيجينات السوطية اقترح الباحثان Krywien czk and Angus (١٩٦٧) وغيرهم تقسيم سيرولوجي

للبلورات الموجودة في خلايا Bt من المثبر للدهشة انه لاسيرولوجي الاسواط أو البلورات تشير الى انشطة الدلتا-اندوتوكسينات لل عزلات المختلفة من Bt.

هذا يقودنا الى ان العامل المفتاح أو المحدد لعزلات Bt محل التساؤل: الذي يجعل النوع محل اهتمام كبير ومتميز ان التوكسينات الناتجة بواسطة العزلات المختلفة من بكتريا Bt تختلف في سميتها تجاه نفس نوع الحشرات أو تختلف في نشاطها الالابادي ضد الحشرات . السؤال لماذا هذا الوضع وماهي التداخلات بين الدلتا-اندوتوكسينات المختلفة؟ هذا كله لم يرقى لمرحلة الفهم الكامل. لا جدال في ان هناك اوجه تشابه كبيرة فيما بينهما حيث انها جميعا عبارة عن بروتينات ذات اوزان جزيئية عالية وجميعها يجب ان تؤكل وتهضم حتي تحقق الفاعلية (كيف يقولون ان Bt فعالة على بيض حشرة دودة ورق القطن) . كذلك يجب ان تكون هناك علاقة بين سيرولوجي تحت الانواع التي تنتج التوكسين ومدى النشاط و الفاعلية للدلتا-اندوتوكسينات التي تنتجها ولكن الارتباطات غير كاملة.

التركيز القاتل النصفى LC50 والوحدة الدولية : كما نوقش قبلا فان العديد ان لم يكن جميع نواتج التخمير الفعالة بيولوجيا ذات جزيئات معقدة يصعب قياسها وتقييمها كيميائيا . مع العناية المناسبة والطرق المناسبة يمكن عمل تقييم حيوي عالي الجودة للعديد من المستحضرات الميكروبية. مازال التقييم الحيوي يستخدم على نطاق واسع مع العديد من المنتجات عريضة الانتشار على المستوى التجاري مثل فيتامين B12 والاريترومايسين والبنسيلين والعديد من نواتج التخمير التي تبني الحشرات entomocidal . بالطبع فان تكرار التقييم الحيوي من الامور الضرورية حيث ان استخدام 3-4 مكررات حيث يمكن تقليل الخطأ بقدر الامكان لاقل من 20% على امتداد 7 أيام. عن ميكانيكية التقييم الحيوي لبكتريا Bt نقول ان التقييم الحيوي يقارن التداخل بين حشرة الاختبار والتوكسينات تحت الظروف القياسية. الاستجابة الأكثر اثاره للحشرة من المعاملة بالمبيد الحشري الميكروبي وتلك التي يسهل ملاحظتها هي الموت. من اكثر طرق التعبير عن القتل دقة لعينات الباسيلليس Bt هم معيار "التركيز النصفى القاتل LC50" وهو التركيز النظري الذي يقتل 50% من الحشرات. هذا التركيز يقدر بتعريض مجاميع من اليرقات لتركيزات مختلفة من العينات في غذائها ثم تحضينها لفترة قياسية من الوقت وتسجيل النسبة المئوية للقتل لكل تركيز ثم استخدام تحليل الانحدار لتقدير LC50 لكل عينة. من الأهمية تحقيق دقة التقييم الحيوي كما حددها العلماء Dulmage وآخرون (1981)، de Barjac (1984). لقد

اتفق على أن سر التقييم الحيوي الدقيق يكمن في استخدام المعايير القياسية. معظم مستحضرات Bt تقيم عن طريق المعيار القياسي LC50 وهذه تختلف من يوم ليوم بصرف النظر عن مدي العناية بحشرات الاختبار أو مدي تجانس الحشرات في المزرعة (جنول ٤-٤، ٤-٥). هذا التباين يمكن تقليصه بالتقييم الحيوي لمستحضر قياسي مع عينات الاختبار باستخدام نفس مجموع الحشرات في كل فترات التقييم الحيوي ومقارنة LC50 للمركب القياسي في مقابل LC50 لعينات الاختبار (Dulmage وآخرون ١٩٨٨). في الوقت الحالي تم الاتفاق على ثلاثة مواد قياسية كما أقرتها الهيئات العلمية. المواد القياسية مدونة في الجدول التالي حيث يستخدم المادة القياسية HD-1 في التقييم الحيوي ضد حشرات حرشفية الاجنحة بينما تتميز مركب IPS-82 كمادة قياسية ضد البعوض والذباب الأسود.

| المادة القياسية | الكفاءة |
|-------------------------|------------------|
| <i>Name of Standard</i> | <i>Potency</i> |
| HD-1-S-1971 | 18.000 IU/mg* |
| HD-1-S-1981 | 16.000 IU/mg** |
| IPS-82 | 15.000 ITU/mg*** |

- * U.S.D.A. Official Standard
 ** Proposed U.S.D.A. Replacement Standard
 *** World Health Organization (WHO) Standard.

جدول (٤-٤) : حساب كفاءة المساحيق الجافة للثلاثا-انفوتوكسينات للبكتريا Bt
 ١ - المعادلة أو الصيغة الاساسية:

| | |
|--|--------------------|
| كفاءة عينة | للمستحضر القياسي |
| الاختبار | Lc50 |
| (IU/MG) = | Lc50 عينة الاختبار |
| X كفاءة المستحضر القياسي (وحدة دولية / ملجم) | |

٢ - عندما تستخدم HD-1-5-1971 كمستحضر قياسي تصبح المعادلة:

| | |
|---------------------------|---------------------------------|
| كفاءة عينة الاختبار | Lc50 للمركب القياسي HD-1-5-1971 |
| (وحدة دولية / ملجم) = | Lc50 عينة الاختبار |
| X ١٨٠٠٠ وحدة دولية / ملجم | |

جدول (٤-٥) : الحسابات الافتراضية لنسب Tn / Hv المحتوية على واحد أو اثنين من الدلتا-اندوتوكسينات ذات المدى المختلف من النشاط

| | Powd er A | Powd er B | powd er C | powder D |
|---|--------------|--------------|--------------|-------------|
| Assays against <i>Trichoplusia ni</i> | | | | |
| Lc50 standard, (ug/ml) | 11.2 | 11.2 | 11.2 | 11.2 |
| Lc50 sample, (ug/ml) | 20.0 | 4.0 | 4.0 | 16.0 |
| Potency of sample, (IU/mg) | 10.00 | 50.00 | 50.00 | 12.500 |
| Assays against <i>Heliothis virescens</i> | | | | |
| Lc50 standard, (ug/ml) | 2.8 | 2.8 | 2.8 | 2.8 |
| Lc50 standard, (ug/ml) | 5.0 | 1.0 | 2.0 | 2.0 |
| Potency of sample, (IU/mg) | 10.00 | 50.00 | 25.00 | 25.000 |
| Tn/Hv ratio ^a | 1.0 | 1.0 | 2.0 | 0.5 |

Source : Adopted from Dulmage, 1979, Activity ratios are discussed at length by Dulmage and Cooperators, 1981.

Note : Powder A and powder B are homologous to themselves and to the standard, and powder C and powder D are neither homologous to the standard nor to each other.

$$^a\text{Tn/Hv ratio} = \frac{\text{potency vs. Tni (IU/gm)}}{\text{Potency vs. H. virescens (IU/mg)}}$$

عن معايير تقييم دقة الاختبارات الخاصة بالتقييم الحيوي تشير الى النقاط التالية:

- ١- يجب ان تكون نسبة الموت في يرقات المقارنة اقل من ١٠% وهذا امر مطلق.
- ٢- يجب اختيار سلاسل من التركيزات حتي نصل الى خمسة تركيزات على الاقل مع عينات الاختبار وسبعة تركيزات مع المركب القياسي بما يحقق مالا يزيد عن ٩٠% أو يقل عن ١٠% موت.
- ٣- يجب ان يكون ميل منحنيات الاتحاد معقول كذلك الذي يتحصل عليه من الميول السابقة ضد الحشرة تحت الاختبار وفي حدود اخطاء العينات اليومية والتي تتوافق مع بعضها.

٤- إذا كان التحليل بالحاسب الآلي يسيراً فإن حدود الثقة ٩٥% حول التركيز النصفى القاتل Lc_{50} يجب أن تكون كذلك الموجودة بين الحد الأقصى/ الحد الأدنى وتصل لأقل من ٢

٥- على نفس المنوال فإن حدود الثقة ٩٥% حول الوحدة الدولية IU يجب أن تقدر كما أن النسبة بين الحد الأقصى/ الحد الأدنى تكون أقل من ٢

٦- يجب أن يكون التقسيم الحيوي على مدى ثلاثة أيام بشكل منفصل. الوحدات الدولية تقدر مع كل يوم من هذه الأيام الثلاثة ثم يؤخذ المتوسط ويجب أن يقدر الانحراف القياسي ويكون أقل من ٠,٢ هذه البيانات يجب أن تستخدم لتقدير معامل التباين (٢٧) بين مكررات التقييم (الانحراف القياسي/المتوسط).

هذه المعايير تسمح بالتخلص من المتاعب "trouble shoot" في المراحل المختلفة من التقييم الحيوي. لقد علمتنا التجارب أن معامل التباين (٢٧) بين التقييم الحيوي العقلائي يصل لأقل من ٠,٢ (ممكن أن تكون أقل من ١٥ ومع البعوض). المعامل الأعلى من هذه القيمة يوضح وجود خطأ ما مع عينة الاختبار أو في مزرعة الحشرة المستخدمة أو في الطرق التي يتبعها مسئولو التقييم الحيوي.

مدي فعالية و نشاط بكتريا الباسيلليس Bt: الجدول (٤-٦) يوضح مدي فعالية جزئى للـلتا-اندوتوكسين التى ينتج بواسطة عزلات تقليدية من Bt . أظهرت النتائج أن مدي الفاعلية للعزلات الثلاثة من تحت النوع كورستاكي HD263, HD73, DH-1 تختلف بعضها البعض ولو أنها تملك السيرولوجية السوطية. يلاحظ أن العزلات HD73 , HD-1 تختلف بعضها عن الآخر في سيرولوجية البلورات مما يتوقع معه اختلاف في الفاعلية. هذا مع أن العزلات HD-1, HD-263 تختلف في مدي النشاط ولو أن لهما نفس سيرولوجية البلورات. الاختلاف قد يتعارض. من المثير للدهشة مقارنة HD-73 مع HD-83 وهي عزلة تقليدية تحت النوع اليستي: العزلة HD-73 مع العزلات الأخرى تحت النوع كورستاكي فعالة ضد حشرات H-virescens, T-ni أما العزلة HD-73 غير فعالة ضد B.mori . على العكس فإن عزلات تحت النوع العسيتي غير فعالة ضد H.virescens أو T.ni ولكنها شديدة الفعالة ضد B.mori أو H.cunea . لقد وجد أن

عزلة HD-182 تختلف عن كل العزلات الاخرى في الفاعلية ضد *H.cunea* وليست ضد *B.mori*.

يمكن ملاحظة وجود اختلاف هام ومميز عند انتاج التوكسينات بواسطة عزلات معظم تحت انواع *B.t.* بالمقارنة بالتوكسينات التي تنتج بواسطة عزلات تحت النوع اسرائيلينسيس مثل HD-567. الدلتا-اندوتوكسينات فعالة ضد حشرات حرشفية الاجنحة بينما هي قليلة الفاعلية ضد البعوض. عزلات تحت النوع اسرائيلينسيس على العكس قليلة الفاعلية أو عديمة الفاعلية ضد حشرات حرشفية الاجنحة ولكنها شديدة الفاعلية ضد البعوض والذباب الاسود المائية. من المناقشات التي اظهرت اختلافات في الرؤى والاداء ماصرح به كاتب المقال من ان سمية هذه التوكسينات لا تتوقف على تحت النوع. هذا الموقف يتجه نحو التعقيد خاصة عند تتسع مدى الفاعلية لتوكسينات *B.t.* من خلال اعتبار مدى واسع من انواع الحشرات عند تحديد النشاط سنوات عديدة ساد الاعتقاد ان الاندوتوكسينات للباسبيليس *BT* فعالة ضد حشرات حرشفية الاجنحة مع حالات قلة الفاعلية مع قليل من انواع البعوض. التطور التجاري لمستحضرات *BT* تتمشي مع هذه الاعتقاد كما ان استخدام المستحضرات ذات الفاعلية على حشرات حرشفية الاجنحة زادت بشكل بطيء على امتداد السنوات الخمس عشر الماضية. على سبيل المثال فان الاندوتوكسين المشتق من تخمر تحت النوع كورستاكي (*HD-1*) يستخدم في مكافحة افات المحاصيل الحقلية مثل نطاط الكبريت *T.ni* وثاقبة الذرة الاوربية وافات المواد المخزونة و حشرات الدخان و الغابات وغيرها. لم يكن الاستخدام التجاري قاصرا على تحت النوع كورستاكي حيث استخدم عزلات من تحت النوع *aizawai* ضد حشرة الشمع وكذلك تحت النوع سان ديجو لمكافحة الديدان القارضة.

جدول (٤-٦): مقارنة فاعلية ٩ عزلات من الباسبيليس تورينجينسيس ضد أربعة حشرات من حرشفية الاجنحة وخمسة أنواع من البعوض.

| Potency (IU / mg) | | | | | | | |
|-------------------|--------------|------------|----------|--------------|----------|----------|-------------------|
| Culture | Subspecies | Cryst Type | T. ni | H. virescens | H. Cunea | B. mori | Mosquito Activity |
| HD-59 | Thuringensis | thu | 7.960 | 1.440 | 13.900 | 1.300 | Inactive |
| HD-83 | alesti | ale | Inactive | Inactive | 93.200 | 27.500 | Inactive |
| HD-1 | kurstaki | k-1 | 39.800 | 15.400 | 47.200 | 50.500 | Inactive |
| HD-263 | kurstaki | K-1 | 39.600 | 54.600 | 18.100 | 18.400 | Inactive |
| HD-73 | kurstaki | k-73 | 29.300 | 34.500 | 15.400 | inactive | Inactive |
| HD-168 | galleriae | G-1 | 16.300 | 10.100 | 86.700 | 6.200 | Inactive |
| HD-29 | galleriae | G-9 | 6.760 | 341 | inactive | 7.400 | Inactive |
| HD-135 | aizawai | Aiz | 18.000 | 1.460 | 134.100 | 75.900 | Inactive |
| HD-567 | israelensis | isr | inactive | inactive | inactive | inactive | High act. |

لقد تم تقييم ووضع برنامج واسع بواسطة الباحث Dulmage وآخرون (١٩٦٧) بهدف البحث عن عزلات أكثر كفاءة وفاعلية من البكتريا B.T. . لقد ادى هذا البرنامج الى اكتشاف العزلة HD-1 التى وجدت أكثر عنفا بمقدار من ١٠ وحتى ٣٠ مرة عن العزلات السابقة. لقد تبع ذلك بحوث مضمينة بواسطة Goldberg and Margalit (١٩٧٧) للبحث عن ممرضات لمكافحة البعوض وأسفرت عن الحصول على عزلات من تحت انواع جديدة للبكتريا B.t. (تحت النوع اسرائيلينسيز) ذات فاعلية عالية ضد البعوض والذباب الاسود المائي. الملاحظات المبكرة التى اشارت الى ان القليل من العزلات لبكتريا Bt (بداية هي ضمن النوع HD-1-K-1) قليل الفاعلية ضد البعوض اخذت في الاعتبار في الدراسات الاكاديمية فقط. لقد اتسعت دائرة البحث عندما اكتشف ان التوكسين الناتج من انواع جديدة من الباسيلليس سفيريكس شديد الفاعلية ضد البعوض. بعد ذلك اظهرت التجارب الحقلية ان عزلة H-14 فعالة حتى المستويات الاقتصادية. لقد كان الكشف عن تحت النوع اسرائيلينسيز عامل مساعد ومحفز للبحث عن عزلات اخرى من البكتريا Bt التى تنتج دلتا-اندوتوكسين فعال ضد رتب اخرى من الحشرات. لقد كللت هذه البحوث بالنجاح رغم البطيء وبعد ٢-٣ سنوات اكتشف تريج وآخرون (١٩٨٣) تحت نوع جديد من Bt وهي تينبيريونيس الذي ينتج دلتا-اندوتوكسين فعال ضد العديد من حشرات غمدية الاجنحة خاصة خنفساء الكلورادو. نفس الشيء حدث مع تحت النوع سانديجو الفعال ايضا ضد غمدية الاجنحة. مازال الطريق مفتوح للحصول على عزلات جديد على عزلات جديد لفعال ضد البعوض.

نسب الفاعلية Activity Ratios: كما نوقش قبلا فان التقييم الحيوي يعتبر مقياس للنشاط و الفاعلية ولكنه لا يعتبر مقياس دقيق يحدد المادة التى تؤخذ كاسنس للمقارنة و كالميزان. الوحدة الدولية IU التى تقدر في التقييم الحيوي لبكتريا Bt تعكس السمية النسبية للينة تحت الاختبار مع المستحضر القياسي ضد انواع الحشرات المدروسة. لذلك فان IU التى تسفر عنها تجارب التقييم الحيوي تعتمد ليس فقط على كمية ونوع الاندوتوكسين في المسحوق ولكن كذلك على الحشرات المستخدمة في التقييم الحيوي. بالطبع فان الوحدات الدولية IU_S التى يتحصل عليها مع التقييم الحيوي لمسحوق البكتريا ضد الحشرات من الانواع المختلفة لا يمكن ان تكون متشابهة الا اذا كان التوكسين محصل التقييم متماثل مع نظيره القياسي. هذا التصور ادى الى العديد من التساؤلات واجبة الاجابة و التنفيذ نذكرها فيما يلي:

- ١- اذا كانت العينة القياسية وتلك المعرضة للاختبار تحتوي على نفس الدلتا- اندوتوكسين فان الوحدات الدولية IU_S التي تقدر في التقييم الحيوي ضد انواع حشرية مختلفة لابد وان تكون متطابقة (في هذه الحالة كاننا نقارن بين التوكسين ونفسه).
- ٢- اذا كانت الوحدات الدولية IU_S المقطرة في التقييم الحيوي على نوعين مختلفين من الحشرات متطابقة فان هذا يعتبر دليل وليس دليل استدلالى ان عينة الاختبار متجانسة ومتماثلة مع المستحضر والمادة القياسية.
- ٣- اذا كانت الوحدات الدولية غير متماثلة أو متطابقة بين نوعي الحشرات المختبرة كان ذلك دليلا على عدم تجانسها مع المادة القياسية.
- ٤- التشابه (أو عدم التشابه) لبكتريا Bt يمكن تقييمه كمياً بواسطة نسبة رياضية بسيطة. يطلق على هذه النسبة "نسبة الفاعلية activity ratio".
- ٥- نسبة الفاعلية وحدها لا تستطيع التمييز بين الانواع المختلفة من بكتريا Bt. الوحدات الدولية تقيس كمية اندوتوكسين Bt في المسحوق أو ناتج التخمر حيث ان التركيز النصفى القاتل Lc50 يعتبر وسيلة جيدة للقياس. معامل التباين يوضح نوع اندوتوكسين Bt الموجود مع استخدام نسبة النشاط كمقياس.

نسبة النشاط يمكن ان تستخدم للمقارنة بين نوعين حساسين من الانواع الحشرية. لكي نتجنب سوء الفهم أو التشويش يكون من الضروري اتباع طريقة مناسبة لتحديد أي من الانواع الحشرية تستخدم في حساب النسبة. في هذا المقام قام الباحث بوضع الحرف الاول من الاسم الشائع للجنس و الحرف الاول من اسم النوع لتوضيح نوع الحشرة ومكان الحشرة في الجزئية. لذلك فان $Tn = T. ni$ ، $Hv = H. virescens$ ونسبة الفاعلية تعرف على النحو Tn/Tv . الجدول (٤-٤) يوضح حساب نسبة الفاعلية بناء على التقييم الحيوي ضد $H. virescens$ و $T. ni$

يمكن استخدام معامل التباين (٢٧) Coefficient of variation لتقييم نسبة الفاعلية. الجدول (٤-٧) يوضح قيم نسبة النشاط حيث يوضح فاعلية مساحيق تحت النوع كورسناكي (HD-1) المقاسة في التقييم الحيوي بين $H. virescens$ ، $T. ni$. المساحيق انتجت في اوساط مختلفة و متعددة كما تختلف عن بعضها البعض في الفاعلية. معامل التباين لمختلف المساحيق بلغت في المتوسط ١٩٢ و هي في حدود الخطا التجريبي. مما يوضح ان التوكسينات الموجودة في كل مسحوق هي نفسها بالرغم من الاختلافات في

كميات المسحوق الناتجة أو الوسط الذي تنتج فيه. الاسهام الاكثر اهمية لمعامل التباين يتمثل في المساعدة في التفريق بين نسبة الفاعلية بطريق مشابه للفرقة بين كفاءة مساحيق بكتريا Bt. اذا كان معامل التباين اقل من ٣٣ و فانه يفترض انها تنتمي لنفس المجموعة اذا كان معامل التباين اكبر من ٣٣ و فانه يفترض ان بعض المساحيق في المجموعة ينتمي الى مجموعات مختلفة. التقييم الحيوي للمساحيق الفردية يمكن ان يتأرجح في وقت معين بين المجاميع حتي يتحصل على توزيع ما يتواءم مع العديد من المساحيق بقدر الامكان في مجاميع. هذه ليست طريقة احصائية موثوق فيها ولكنها يمكن ان تتبع للفرقة بين الانشطة المختلفة و بسرعة و بسهولة.

جدول (٧-٤): تأثير الوسط على انتاج الدلتا-اندوتوكسين بواسطة سلالة الباسيلليس تورينجيسيز HD-1 في وحدة تخمر ١٤ لتر.

| Experi ment No. | Medium Ingredients (g/liter) ^a | | | | Yield Kiu/ml) ^b | |
|-----------------------|--|---------|---------------|-------------------------|----------------------------|--------------------|
| | Cottons eed flour | Glucose | Corn steep | Trichop -lusia ni | Heliothis virescens | Tn/Hv Rastion c |
| 1 | 20 | 15 | - | 414 | 298 | 1.39 |
| | 30 | 40 | 25 | 834 | 365 | 2.28 |
| | 30 | 20 | 25 | 893 | 472 | 1.89 |
| 2 | 20 | 15 | 10 | 711 | 278 | 2.56 |
| | 30 | 40 | 10 | 797 | 381 | 2.09 |
| | 30 | 40 | 10* | 515 | 246 | 2.09 |
| 3 | 30 | 40 | 50* | 1730 | - | - |

^a-All media, except those designated by *media contained yeast extract, 2.0 ; peptone, 2.0 ; MgSO₄7H₂O, 0.3 ; FeSO₄, 7H₂O, 0.02 ; ZnSO₄, 0.02 ; CaCO₃, 1.0.

^b-Measured against T. ni and H. virescens, using HD-1-S-1971 as a referenced standard, HD-1-S- 1971 contains 18.000 IU/mg = international units x 10³

^c-IU./ml measured against T. ni divided by IU/ml measured against H. virescens. Reproducibility of Tn/Hv ratio : n = 6 ; Avg. = 2.050 ; SD = 0.394 ; CV = 0.192.

المعيار في عملية تخمرات بكتريا Bt نالت الكثير من الاهتمام ولو ان عملية التخمير سهلة الاجراء بوجه عام دون اية طلبات خاصة للنمو او تكوين البلورات. ليس هناك دراسات لكل المعايير بنفس التفاصيل ولكن ما درس يشير الى اهمية درجة حرارة التحضين. الجدول (٨-٤) يوضح ان النمو والمحصول الناتج متساوي تقريبا مع درجات حرارة من ٢٦ وحتى ٣٤ م. على درجة حرارة ٣٧ م أظهر الفحص الميكروسكوبي للخلايا في وحدة التخمير وجود شرائط طويلة من الخلايا ومحصول قليل بشكل كبير. لذلك لا توجد ميزة لتنمية مزارع Bt على درجات الحرارة العالية بهدف الانتاج لذلك نضبط الحرارة على درجة ٣٠ م في وحدات التخمير.

جدول (٨-٤) : تأثير حرارة التحضين على نمو وانتاج الدلتا-اندوتوكسين بواسطة الباسيلليس تورينجيسينز السلالة HD-2b3 في وحدة تخمر ١٤ لتر.

| المحصول وحدة دولية لكل مليلتر | عدد الجراثيم (x 10) | أقصى محصول مع الساعات | حرارة التحضين (C) |
|----------------------------------|--------------------------|--------------------------|----------------------|
| 283 | 80 | 39-42 | 37 |
| 1.150 | 170 | 18-24 | 34 |
| 1.500 | 220 | 34-39 | 30 |
| 1.450 | 240 | 39 | 30 |
| 1.630 | 200 | 39-42 | 26 |

^aMeasured against *Heliothis virescens* ; Kiu = International Units v x 10³

التهوية عامل هام جدا في تخمر Bt حيث اوضح دفاج وآخرون وفودة وآخرون (١٩٨٥) الصعوبة الشديدة لتنمية واصلاح Bt خلال الساعات العشر الاولى من التخمير المغسور بسبب الحاجة الكبيرة للأكسجين. عن ثبات نسبة الفاعلية تم الاختيار العشوائي لخمسة عزلات من بكتريا Bt تحت مدي واسع من الظروف واجري التقييم الحيوي ضد حشرة دودة اللوز الامريكية. اظهرت النتائج المتحصل عليها في جدول (٩-٤) انه بالرغم من وجود مدي واسع من الانتاج بين الطرز السيرولوجية المختلفة فان معامل التباين لهذه المستحضرات جميعا كان ثابتا. لقد كان معامل التباين للمساحيق المختلفة قريب جدا من المدي ٢٣. وحتى ٣٢. من الناحية العملية فان الشركة التي تنتج Bt يجب ان تكون قادرة على الاعتماد والوقوف في ثبات كفاءة وفعالية التوكسين من تحضيره لاخري او تكون

تكاليف العملية باهظة. يطلق على ثبات النتيجة من التقييم الحيوي أو غيره الاصطلاح "reproducibility"

استرجاع الناتج الفعال من وحدات التخمر **Recovery** : طريقة الاسترجاع من التخمر على المستوى المعمل للتخمر (١-٢ لتر) موضحة في الجدول (٤-١٠). الاسترجاع المستخدم مع رج اواني التخمر تعني طريقة تحضير مع طرد مركزي اولى في اطباق جهاز الطرد المركزي. من المهم اضافة الاسيتون ببطيء والسماح بالثبات لمدة ٣٠ دقيقة قبل الترشيح في اوعية الشفط باستخدام ورق ترشيح واتمان ٢ # في هذه المرحلة وعندها يحدث ترشيح سريع ومن ثم مشاكل ماعدا الناجمة عن الغسيل غير اللائق بالاسيتون.

جدول (٤-٩) : ثبات نسب الفاعلية لمستحضرات من تخمر خمسة عزلات من باسيليس تورينجينسيز في مخمر سعة ١٤ لتر

| المزرعة | عدد المستحضرات المختبره (a) | متوسط النسبة Tn/Hv | معامل التباين |
|---------|--------------------------------|-----------------------|---------------|
| HD-1 | 60 | 2.40 | 0.25 |
| HD-129 | 59 | 5.63 | 0.32 |
| HD-241 | 26 | 0.63 | 0.24 |
| HD-244 | 26 | 1.54 | 0.23 |
| HD-263 | 136 | 0.44 | 0.29 |

^aIncludes formulations from different media or fermentation conditions and from different times of harvest.

^bInternational unit (IU) /ml measured against *Trichoplusia ni* divided by IU/ml measured against *Heliothis virescens* IU determined against HD-1-S-1971 as a standard. HD-1-S-1971 contains 18.000 IU/mg

تبرز مشاكل مختلفة عند تخفيف الرش في مصنع الإنتاج (جدول ٤-١١) حيث يتم استخدام طرد مركزي مع انسياب مستمر ومع هذا قد نواجه مشاكل مع مواد صلبة عديدة تضطربنا لابقاف العملية والبداية مرة اخرى. هذه تمثل مشكلة ميكانيكية (ليست مشكلة استرجاع) حرارة الدخول والخروج يجب ان تتوافق تبعا لعملية الإنتاج. في هذه المرحلة يتم اضافة أي ماد مساعدة للبلل او الانتشار الى العجينة التي نستهدف الحصول على المستحضر النهائي منها كلا الطريقتان يسهل اتباعها مع قليل من النقد في الفاعلية.

جدول (٤-١٠) : عملية استرجاع معقد الجراثيم - البلورات للباسيليس تورينجيسيز على مستوى المعمل.

| | |
|--|-----------------|
| المكونات الكلية - حموضة ٨,٤-٨,٧ في المخمر ضبط الحموضة الى (٧) بواسطة حامض يد كل - طرد مركزي للبقايا | الرائق (يستبعد) |
| يقلب في ١٠/١ - ٢٠/١ بالحجم ٤-٦ % لاكتوز يضاف ببطيء مع الرج ٤-٥ % بالحجم اسيتون يقلب لمدة ٣٠ دقيقة ثم يترك لمدة ١٠ - ٣٠ دقيقة | |
| الترشيح مع الشفط ثم يقلب المخلفات مع الرج مع حجم صغير من الاسيتون. | الراشح (يستبعد) |
| الترشيح مع الشفط وتقلب البواقي مع حجم قليل اسيتون | الراشح (يستبعد) |
| الترشيح مع الشفط و يخفف طول الليل | الراشح (يستبعد) |

جدول (٤-١١) : عملية استرجاع معقد الجراثيم / البلورات للباسيليس تورينجيسيز:

إنتاج على مستوى اكبر في المصانع

تجفيف الرش

كل المكونات = درجة حموضة ٨,٤ - ٩,٠

طرد مركزي (مع انسياب مستمر)

بقايا او مخلفات (قشدي ثقيل)

تجهيز العجينة (بناء على وزن القشدة)

يضاف ١٠ % لاكتوز، ١٠ % مادة ناشرة، ١٠ % مادة مبللة

خلط متجانس

ضبط المكون الصلب الكلى لحوالى ٢٠ %

الرش الجاف (تغذية بشورية بالطرد المركزي)

حرارة الدخول ١٢٥-١٥٠ م

حرارة الخروج ٧٥-١٠٠ م

المستحضر

الاستقراء من التجارب المعملية الى الحقلية Extrapolation:

من المعروف ان الممرضات البكتيرية والفيروسية للحشرات كلها تعمل كسموم معدية Stomach poisons حيث يجب ان تقوم الحشرات باكل وهضم الممرضات حتي تحدث الفاعلية وسوف اكتب هاتين العمليتان بالانجليزية كي يتأكد من يقولون بتاثير هذه المستحضرات خاصة Bt على بيض الحشرات.

Bacterial and viral insect pathogens all act as stomach poisons.
They must be eaten and digested to be effective.

يجب ان نؤخذ هذه الحقيقة في الاعتبار في أي برنامج لاستخدام هذه الممرضات ليكن معلوما انه ليست كل حشرة حساسة للممرض الحشري. بيئة ومكان معيشة الحشرة قد تجعل من الصعوبة تحقيق التلامس بين الحشرة ومسبب المرض. مثال ذلك انه عقد مقارنة فعالية مستحضر HD-1 في المعمل مع مستحضر دودة اللوز القرنفلية والشوكية نجده اكثر فعالية ضد دودة اللوز القرنفلية ثم T.ni. في الحقل يحدث العكس حيث لا ينجح HD-1 في مكافحة دودة اللوز القرنفلية ولكن يكافح T.ni في حقول القطن. السبب بسيط وهو يتمثل في ان حشرة T.ni تقضي ساعات التغذية على سطح اوراق القطن وهي المساحات المغطاة جيدا بالمستحضر HD-1 من جهة اخري فان بيض دودة اللوز القرنفلية توضع بالقرب من النموات الجديدة الطرفية النامية وبراعم نباتات القطن كذلك فان البرقات حديثة الفقس تنقب في الحال البراعم والنموات الطرفية ومن ثم تهرب من التغذية على البكتريا Bt مرة اخري اقول للزملاء في معهد بحوث وقاية النباتات ومركز الهندسة الوراثية التابعين امركز البحوث الزراعية - وزارة الزراعة : بالله عليكم كيف يقضي مستحضر Bt الاجرين المحلي العظيم الانجاز على بيض دودة ورق القطن؟

من الناحية النموذجية فان الحشرة المستهدفة التي تستخدم في اختبارات التقييم الحيوي في المعمل يجب ان تكون هي نفسها التي يراد مكافحتها في الحقل. في بعض الاحيان يكون ذلك مستحيلا لان اعداد المعمل للحشرات المستهدفة المتاحة محدود بسبب عادات الحشرة في التغذية والمعيشة وامكانيات وقدرات المعمل. في هذه الحالة قد يكون من الضروري اجراء اختبارات التقييم الحيوي على حشرة بديلة. هذا يمثل جانب كبير من الخطورة لان مدي الفاعلية للممرضات المختلفة او المستحضرات المختلفة يختلف بشكل كبير كما نوقش قبلا. انواع من نفس الجنس ليس من الضروري ان تستجيب بشكل متماثل مع الدلتا - اندوتوكسينات المختلفة. مثال ذلك فان استجابة حشرات دودة ورق القطن و الدودة القارضة للبكتريا Bt المختلفة سواء في المعمل او الحقل غير متماثلة.

نفس الوضع مع ديدان اللوز *H.zea* , *H.virescens* حيث استجابتها في المعمل تختلف عن الحقل لمستحضرات Bt.

تصميم برنامج تقييم حيوي للمفاضلة بين المستحضرات المختلفة Screening الاصطلاح " برنامج المقارنة بالاختبار Screening program " ربما يكون مشتق من العملية التي يقوم بها عمال البناء من فصل الرمل الى درجات بداية الدقيقة والمتوسطة والخشنة. البناء لا يستطيع نخل الرمل لفصل كل هذه الدرجات في نفس الوقت. يجب عليه ان يجري نخل متتابع للحصول على الدرجة المطلوبة وفصلها. السؤال الان هل هذا ما يحدث في برامج المفاضلة التجريبية مع ممرضات الحشرات. يجب علينا ان نصمم برنامج خطواتي عقلائي ومعقول يعمل على انتخاب وتوكيد وتعضيد المزارع الفعالة محل البحث. الهدف يتمثل في وضع برنامج يعمل على الكشف عن العزلات الفعالة من بين اعداد المعايير المرغوبة في برنامج كالذي نحن بصددده وحيث المزارع الميكروبية يحكم عليها عن طريق قدرتها لقتل الحشرة المستهدفة ومن ثم يكون المعيار المناسب هو النسبة المئوية للقتل. يجب ان نتذكر ان الاختبار الذي نقوم به يعتبر اختبار حيوي وفيه يوجد تباين وراثي معقول. القرار يجب ان يكون تحكمي او اعتباطي بناء على خبرة الباحث الوسيلة المعقولة لاختبار تركيبة معيار معين تتمثل في " نسبة مئوية قاطعة Cut-off " وهي تعني نسبة القتل التي تقبل كدليل للتعبير عن الفاعلية وهي يجب الا تزيد عن ١٥-٢٠% من المزارع تحت الاختبار. هذا سوف يؤدي للكشف عن معظم العزلات فاعلية ولكنه سوف يسمح باختبار بعض العزلات غير الفعالة. برنامج التقييم الحيوي التفضيلي يجب ان يكون بسيط بقدر الامكان مع Bt المستخدمة في الاختبار والناحية على ١٠٠ ملليمتر من البيئة. العزلات التي تنجح مع هذا التقييم الاولى يتم اعادة عزلها واعادة اختبارها تحت نفس الظروف كما في الحالة الاولى. العزلات التي تمر من التقييم الثاني بنجاح يعاد اختبارها وتوضع في اطباق اجار مغذية ويتم عزل من ٥-١٠ مستعمرات من البكتريا Bt كمزرعة مرجعية.

REFERENCES

- Barjac, H., de and Larget-Thiery, I (1979). Proposal for the adoption of a standardized from serotype H-14 of *Bacillus thuringiensis*. WHO /VBC/79., 744.
- Barjac, H., de and Larget-Thiery, I (1984). Classification des souches du *Bacillus thuringiensis* par la determination de l'antigene flagellaire. *Entomophage*, 8, 223-229.
- Dulmage, H.T. (1973a). Assay and standardization of microbial insecticides. *Ann. N.Y.A cad. Sci.* 217, 187-199.
- Dulmage, H.T. (1973b). *Bacillus thuringiensis* U.S. assay standard. Report on the adoption of a primary U.S. reference standard for assay of formulations containing the delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis*. *Bull. Entomol. Soc. Am.* 19. (4), 200-202.
- Dulmage, H.T. ; Martinez, A.J. and pena, T. (1976). Bioassay of *Bacillus thuringiensis* (Berliner) delta-endotoxin using the tobacco budworm. *U.S. Dept. Agric. Tech. Bull.* 1528, 16 pp.
- Dulmage, H.T. (1979). In 'Genetics in Relations to insect Management' M.A. Hoy and T.I. Mckelvey. Eds. Pp. 116-127. working papers. The Rockefeller foundation 1979.
- Dulmage, H.T. and Cooperators, (1981). Insecticidal activity of isolates of *Bacillus thuringiensis* and their potential for pest control. In *microbial control of pests and plant Diseases, 1970 – 1980* ed. H.D. Burges, 191-220. London : Academic press.
- Dulmage, H.T. ; Mclaughlin, R.E. ; Lacey , L.A. ; couch T.L. Alls, R. T. and Rose, R.I. (1985). A proposed U.S. standard bioassay for the potency assessment of *Bacillus thuringiensis* subsp. *Israelensis* H-14. *Bull. Entomol. Soc. Am.*, 31, 31-34.
- Dulmage, H.T. ; Correa, J.A. and Morales, G.M. (1989). Problems and progress in the development of microbial insect control agents, *Israel. Journal of Entomology*.

- Dulmage, H.T. (1989). Production and use of *Bacillus thuringiensis*. Perspective from 1989. Mem inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, vol. 84, supl. 113-122.
- Dulmage, H.T ; Gallegos-Morales, G.and correa, J.A. (1990) Potential for improved formulations of *Bacillus thuringiensis* subsp *israelensis* through standardization and fermentation development. In *Bacterial control of Mosquitoes and Blackflies ; Biochemistry, Genetics and Application of Bacillus thuringiensis subsp israelensis and Bacillus sphaericus*. H. de Barjac and D. Sutherland , eds. 110-133.
- Foda, M.S. ; Salama, H.S. ; and salem , M. (1985) factors affecting the growth physiology of *Bacillus thuringiensis*. Appl. Microbiol. Biotechnol. Bioeng. 22, 50-52.
- Goldberg, L.J. and Margalit, J. (1977) Abacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *anopheles sergentii*. *Uranotaenia unguiculata*, *culex univittues* *Aedes aegypti* and *culex pipiens*. Mosq. NEWS ,37 (3), 355-358.
- Heimpel, A.(1967). A taxonomic key proposed for the species of crystalliferous bacteria . J. invertebr. Pathol. 9, 364-375.
- Kireg, A. (1983). Insect pest control in plant protection by *Bacillus thuringiensis* preparations and their influence on the environment. II., Bekämpfung von Anz. Schadlingskd. Pflanzenschutz. Umweltschutz V. 56 (3), 41 ~52.
- Krywienczyk, J. and Angus, T.A. (1967). Aserological comparison of several crystalliferous insect pathogens. J. Invertebr. Pathol., 9, 126-128.
- Krywienczyk, J.; Dulmage, H.T. (1967). A serological comparison of several comparison of several crustalliferous insect pathogens. J. Invertebr. Pathol., 9,126-128.
- Krywienczyk, J. ; Dulmag, H.T. and Fast , P.C. (1979). Occurrence of two serologically distinct groups within *Bacillus thuringiensis* serotype 3ab var. *kurstaki*. J. Invertebr. Pathol., 31, 372-375.

٢- طرق بسيطة لاستخدام باسيلليس تورينجنسيس في المحاصيل الحقلية بما يتلائم مع الدول النامية.

فاعلية الباسيلليس تورينجنسيس (Bt) في مكافحة الآفات الحشرية تأكدت بسبب الجهد المضني الذي أجراه Steinhaus في أوائل الخمسينات. هكذا بدأ الباحث K.A.Jones من معهد المصادر الطبيعية في إنجلترا. هذا مع أن مرضية البكتريا على الحشرات عرفت قبل هذا التاريخ. في الحقيقة فإن البكتريا عزلت منذ زمن بعيد حوالي عام ١٩٠١. وتم وصف النوع بواسطة Berliner في عام ١٩١١ ولكن كان الباحث ستينهائوس أول من أشار إلى إمكانية الاستخدام التجاري لهذه البكتريا في مكافحة الحشرات. منذ ذلك الوقت تزايد الاهتمام باستخدام بكتريا Bt بشكل تدريجي وحتى عام ١٩٧١ حيث تم تسجيل ٢٣ نوع من الحشرات يمكن مكافحتها بواسطة البكتريا على أكثر من ٢٠ محصول (Falcon ١٩٧١). في السنوات الأخيرة زاد الاهتمام بشكل غير مسبوق عن فاعلية ومقدرة Bt في مكافحة الحشرات. لقد كان ذلك بسبب ونتاج العديد من العوامل التي تشمل الاهتمام المتزايد بالمشاكل التي أحدثتها وتحدثها المبيدات التقليدية خاصة وجود مخلفات سامة في كل من المكونات البيئية. العامل الآخر يتمثل في تطور المقاومة لفعل المبيدات ونقص فرص اكتشاف مجاميع جديدة من المبيدات الكيميائية. كذلك فإنه خلال السنوات الخمسة وحتى العشرة الأخيرة اتخذت خطوات كبيرة في اتجاه تطوير بكتريا Bt كمبيدات لقد تضمن ذلك عزل وانتخاب سلالات جديدة فعالة على مدى واسع من الآفات الحشرية مثل B.t. tenebrionis لمكافحة حشرات غمدية الأجنحة (Krieg وآخرون ١٩٨٣). وكذلك تطوير تكنولوجيا الإنتاج مما أدى إلى تقليل التكاليف بالإضافة إلى تحسين المستحضرات لزيادة الثبات على الهدف وتحقيق المكافحة الفعالة المقبولة. كذلك تطوير أسلوب المناورة الوراثية بما فيها إدخال أو زرع جينات السمية في النباتات المهندسة وراثيا (Anon، ١٩٩١) والبكتريا الأخرى (Gelernter، ١٩٩٠). بالإضافة إلى ذلك فإنه من خلال تفاعلات الارتباط Conjugation يمكن تطوير سلالات فعالة ضد حشرات ندية الأجنحة وحرشفية الأجنحة معا (كما في دراسات ومخرجات بحوث العالم Federici، ١٩٩٠).

في الوقت الراهن فإن بكتريا Bt تمثل ما يقرب من ٨٠-٩٠% من سوق المبيدات الحشرية الميكروبية العالمية والتي تصل إلى حوالي ١٠٠ مليون (كارلتون، كاوزون - بيرك، جوشون ١٩٩٠) في الدول النامية مازالت كفاءة Bt محل الاعتبار وما زال العديد من الباحث يحاولون تعظيم دورها في المكافحة وزيادة مجالات الاستخدام. مع تكنولوجيات

المكافحة الجديدة فان مستحضرات Bt يجب ان تصل الى الحشرة حتي تحقق الفاعلية باستثناء النباتات المهندسة وراثيا فان هذا يعني ضرورة استخدام Bt على المحصول بطريق او اخر. بوجه عام فان هذه الجزئية اهملت في تطور مكافحة الحشرات بواسطة بكتريا Bt.

متطلبات التطبيق: تعمل بكتريا Bt بالضرورة كسم معدي Stomach poison ومن ثم يجب ان يتم تناولها بواسطة الحشرة المستهدفة. أي طريقة تطبيق يجب ان توصل بكتريا Bt الى المنطقة من المحصول التي تاكلها الحشرة. هذا ليس بالامر السهل. اذا اخذت دودة ورق القطن كمثال لانها من الآفات الخطيرة التي تهاجم زراعات القطن في مصر ويتم مكافحتها عن طريق الجمع اليدوي للطع البيض واتمام مكافحة بواسطة المبيدات الكيميائية الحشرية (حسني ، ١٩٨٠). الحشرة من أكلي الأوراق النباتية ولو ان الاطوار المتأخرة تهاجم الثمار أي اللوز ومن ثم تعتبر هدف جيد للمكافحة بالمبيدات الميكروبية بما فيها بكتريا الباسيلليس Bt . اهداف المكافحة تتمثل في الأطوار الثلاثة الاولى والتي تحدث اقل ضرر تراكمي والذي قدر باقل من ٢% من التلف الكلي الذي تسببه الاطوار اليرقية (Googyear ١٩٧٨) كما انها اكثر حساسية للمستحضرات الميكروبية. هذه الاطوار الحشرية تقع في اتجاه قمة النبات على السطح السفلي من الاوراق (ابو النصر وآخرون ١٩٦٠ ، خليفه وآخرون ١٩٨٢) حيث تاكل وهذا هو المكان المناسب لرش المستحضر وای محلول حيوي او غيره يقع ويستقر على مواضع اخري تعتبر مفقودة. على نفس المنوال فان الفراشة ذات الظهر الماسي بلوتيللا زيلوستيللا من الحشرات الكبرى على النباتات الصليبية على مستوي العالم توجد كذلك على الاسطح السفلي للأوراق حيث تحفر الاطوار الصغيرة في الاوراق بينما الاطوار الكبيرة تاكل البشرة السفلي فقط (هيل ١٩٨٣) طبيعة الاختفاء او الستر للعديد من الحشرات تخلق مشاكل حادة في طريق التطبيق. في وسط امريكا تعتبر حشرات Heliothis من افات الذرة الخطيرة حيث تتغذي على الاوراق . انواع Heliothis و Helicoverpa من الافات الكبرى للقطن حيث انها بعد الفقس من البيض تتحرك بسرعة كي تتغذي عل الاجزاء الثمرية مع اقل تغذية قليلة على الاوراق (Pearson ١٩٥٨) في هذه الحالة فان التوزيع المتجانس للرش يكون مطلوب لكي يمكن الحشرة من الملامسة و تناول الباسيلليس Bt قبل ان تدخل البراعم واللوز حيث انها اذا دخلت فانها تعتبر في غير تناول المكافحة بواسطة Bt .

اختيارات التطبيق: من اكثر الطرق الواسعة الانتشار المستخدمة لتطبيق وتوزيع المبيد تكون خلال الرش. لقد تعرضت هذه الجزئية لكم هائل من البحوث على امتداد سنوات عديدة بهدف ايجاد الطرق مباشرة لاستخدام المبيدات الحشرية الكيميائية. بكتريا Bt تعتبر سم معدي ولذلك يمكن القول ان كل المبيدات تتطلب تطبيق ومكافحة دقيقة في الموقع المستهدف للحشرة. السموم المعدية تمثل متطلبات المستقبل الواجب استخدامها على موقع تغذية الحشرة. سوف نركز مناقشاتنا في هذا السبيل على التطبيق الارضي. من جهة اخري فان الرش الجوي يقدم تغطية مناسبة للأشجار ويستخدم على نطاق واسع على مستوى العالم لرش المبيدات الحشرية في المساحات الكبيرة للزراعات الحقلية. من الثابت انه مع المحاصيل الحقلية فان الرش الجوي غالبا لا يحقق تغطية جيدة للسطح السفلي لأوراق النباتات اولا تحقق الوصول للمباحات المتجاورة من النبات وهو احد المتطلبات لتحقيق مكافحة فعالة للمبيدات الميكروبية. من النواحي الاكثر اهمية تشير الى ان الرش الجوي لا تعتبر من الخيارات المطروحة امام صغار المزارعين في الدول النامية. لهذا السبب فان استخدام الرشاشات المغمولة على العربات لا تؤخذ في الاعتبار كذلك.

من اكثر الطرق المستخدمة في التطبيق الارضي استخدام الرشاشات الظهرية. توجد تصميمات عديدة مختلفة من هذه الرشاشات ولكن الاساس العام واضح وواحد. يتم خروج الرش خلال نراع وبشابير الى المحصول. حجوم الرش عادة تكون ١٠٠ لتر / هكتار او اكثر. الحامل يمكن ان يوجه الرش على المحصول ولكن في العديد من المواقف فان التغطية للأوراق السفلية و السطوح السفلية لها تكون فقيرة. باستخدام هذه الرشاشات يصبح في الامكان لعامل الرش توجيه الرش على الثمار او ثنيات الاوراق في نباتات الذرة. من الرشاشات الاخرى ذات الحجم الكبير والرشاشات الآلية ذات الحامل في مصر. هذه الرشاشات تخرج ٤٠٠-٦٠٠ لتر/هكتار. مع هذه الحجوم يمكن رش النباتات حتي يتساقط محلول الرش وتقع الكثير من قطرات المادة الفعالة على الارض. اذا لم يتم توجيه الرش بعناية فان نسبة قليلة من الرش تصل الى السطوح السفلي من الاوراق.

في العشرين سنة الاخيرة حدثت تطورات في تكنولوجيا التطبيق لتحسين استقرار سائل الرش على الهدف وتقليل الانجراف وما يستتبعه من تلوث بيئي مع المبيدات الحشرية وعن طريق تقليل حجوم الرش وجعل الرش اسهل من النواحي الطبيعية على القائم بالتطبيق. لقد امكن تحقيق ذلك من خلال استخدام نظام التطبيق الذي يتحكم في القطرات (CDA) استخدام رشاشات الحجم القليل ذات القرص المغزلي تم التوصية بها لمكافحة الحشرات على العديد من المحاصيل بما فيها القطن (Mowlan ١٩٧٣) ومن

شك فان غطاء الرش الذي يتحقق بواسطة هذه الرشاشات تكون جيدة جدا على السطح العلوي للورقة خاصة في الاجزاء العليا والقمية من النباتات. من الخبرات المكتسبة تكونت لدينا قناعة بان تغطية السطح السفلي للورقة يكون فقير جدا كما ان نفاذية الرش في بعض المحاصيل مثل البرسيم تكون فقيرة كذلك. التحسين في تغطية الاوراق السفلية للقرص المغزلي ورشاشات CDA امكن تحقيقها من خلال تطوير الرش الالكتروستاتيكي وتكنولوجياه كما في رشاشة الكتروداين التي طورتها شركة ICI انذاك (1979 Coffee) (1980 ABE) في محطة بحوث روتامستيد في انجلترا (ارنولد وباي 1981). لقد حقق ذلك تحسين مؤكد في تغطية الاوراق السفلي (Mathews 1982) و Jones 1990) ولكن رشاشة الالكتروداين لم تنتشر في الدول النامية كما ان رشاشة ABE غير متاحة تجاريا. الفلاحون الذي يملكون ويستخدمون الرشاشة الظهرية سوف يستمرون في استخدام هذه الرشاشة خاصة لانهم يعرفون ان هذه الرشاشات قابلة للتطوير والتحسين.

من هذا الاستعراض يتضح لدينا اننا في حاجة للنظر في تحسين التغطية التي تحققها الرشاشات التقليدية. في مصر تم مقارنة اداء الرشاشات الظهرية التي ترفع على حامل التشغيل والالية مع الرشاشات المروحية ذات المغزل. اظهرت التجارب على القطن ان كل هذه الرشاشات يمكن تحويلها كي تحقق تغطية للاوراق السفلية والسطوح السفلية للاوراق (Topper 1984، Jones 1990). لقد خلص الى ان تحميل الرشاشة المروحية على عجلة او تريسكل بعجلة واحدة مطلوب لتحقيق تغطية متجانسة وجيدة على الاوراق السفلي: الرشاشات الظهرية الالية تحتاج ان تمسك على مستوى منخفض في المحصول ويجب تحويل حامل الرشاشة الظهرية لتحقيق موضع علوي للبشايير في اماكن واطية من المجموع الخضري. هذا الخيار الاخير هو الاكثر ملائمة بداية لان الرشاشات الظهرية متاحة ومتوفرة ويمكن ان تستخدم للتطبيق على المحاصيل المختلفة. في القطن فان اضافة حامل البشايير التي طورت في التسعينات في افريقيا الوسطي حسنت من التغطية الشاملة وربما افضل مما كان متوقعا (Topper 1984). التجارب التي اجريت في مصر بواسطة معهد بحوث وقاية النباتات بالتعاون مع NRI خلال 1990. اوضحت ان هذه البشايير ذات الفتحات الاصغر ادت الى تحسين في تغطية الاوراق السفلي كما قللت من حجوم الرش. النقد الذي يوجه لهذا الاقتراب يتمثل في اية البشايير ذات الفتحات الصغيرة يسهل انسدادها بواسطة الجسيمات التي توجد في الماء المستخدم في الرش.

اختيار الرشاشة يعتمد على نوع المحصول وتيسر وجودها. في تايلاند فان صنف القطن النامي اطول من الصنف المزروع في مصر (حتى ٢ متر بالمقارنة بطول ١,٥ متر في مصر). هذا يعني ان تغطية الاوراق (الاسطح العليا و السفلى) واللوز في قمة النمو الخضري اسهل كثيرا وهذا هو المكان الذي تضع فيه دودة اللوز الشوكية البيض. هذا يعني امكانية تحقيق فاعلية ومكافحة جيدة دون الحاجة لاستخدام بشابير توجة لاعلى ويكفي استخدام الرشاشة الظهرية الالية في هذا السبيل. في ماليزيا فان مكافحة *P.xylostella* على الخضراوات تتطلب الاستخدام على الاسطح السفلية للاوراق الخاصة بالمحاصيل ذات الارتفاع نصف متر. لذلك فان ذراع الرشاشة المزود بواحد او اكثر من البشابير المواجهة لاعلى والتي تم تصنيعها محليا اوفت بكل الاحتياجات والاعراض.

من المستحيل ان نتكلم عن استخدام الرش الكامل دون ان نأخذ في الاعتبار مستحضر المبيد والذي يؤثر على توزيع الرش وحجم القطرات ومسك الرش. مع مادة ما ذات جسيمات فانها لا بد وان تؤثر على توزيع الجسيمات كما في حالة بكتريا Bt داخل القطرة. مع المواد الميكروبية فان منشطات التغذية غالبا ما تضاف للرش مثل مادة COAX التي تعتمد على دقيق بذرة القطن (Young and Yearian, 1986) هذا قد يشجع التغذية بواسطة الحشرة المستهدفة مثل يرقات دودة اللوز الامريكية الحديثة والتي تحفر على التغذية قبل ان تصل الى لوز القطن. منشطات التغذية الاخرى تم تعريفها وهي تبني على اساس منتجات بسيطة متاحة محليا. مثال ذلك وجبة النجيل grassmeal في الحقل تعمل كمنشط غذائي لدودة ورق القطن (جونز ١٩٩٠).

في بعض الحالات و الظروف يؤخذ في الاعتبار بدائل للرش كما في البرسيم فهو محصول يصعب تحقيق تغطية جيدة ونفاذية مرضية لمحاليل رش المبيدات، لذلك فان استخدام الطعوم الصلبة يمكن ان تؤخذ في الاعتبار . لقد وجد ان وجبة النجيل تجذب يرقات دودة ورق القطن في حقول اللويسيرين في كريت (Campion وآخرون ١٩٨٠). لمكافحة دودة اللوز الامريكية في ثنيات اوراق الذرة يكون الخيار الفعال خلط تجهيز جاف من Bt مع مادة حاملة مسحوق خاملة مثل الصلصال. تسقط هذه المساحيق في ثنيات الذرة وهي المنطقة التي تتغذى عليها الحشرة . في النهاية يجدر القول ان الفهم الجيد لسلوك الافة الحشرية المستهدفة على المحصول يعطي تصور عن أي الافات يمكن مكافحتها بفاعلية باستخدام Bt . مثال ذلك دودة اللوز القرنفلية التي تضع البيض على او بالقرب من براعم القطن وبعد فقس البيض مباشرة تتحرك في اللوز مع قليل من التغذية (Pearson, ١٩٥٨). هذا يعني موقع من اصعب ما يمكن لمكافحة الحشرة باستخدام بكتريا Bt ومن ثم

يفضل استخدام طرق اخري للمكافحة لا تضمن ملامسة الرش او مشاكل التناول مثل الفورمونات المخلقة. خلاصة القول انه لكي تتحقق فاعلية من بكتريا Bt يجب توجيهها للاماكن المناسبة.

REFERENCES

- Abul-Nasr, s. ; moussa, M.A. and Naguib, M.A. (1966). Ecological studies of the cotton leafworm, *prodenia litura* (fab). I-The egg masses in cotton fields. Bull. Ent. Soc. Egypt, Econ. Ser., 57, 353-360.
- Anon. (1991). Gene-engineered cotton in field tests, Ag. Biotech. News and Information, 3 (1), 7-8.
- Arnold, A.j. and pye, B.J.(1981). Electrostatic spraying of crops with the APE80. Proceedings 1981 British crop protection conference, pests and Diseases, 661-666.
- Campion, D.G.; Ellis, P.E.; Hunter-Jones, P.; Mckinley,D.J.; MeVeigh, L.J.; Murlis, J.; Paton, E.M.; Brimacombe, L.; Bettany, B.W.; Cavanagh, G.G. and Jordon, J. (1980). Pheromones and viruses in the control of the Egyptian cotton leafworm, *Spodoptera littoralis* (Boisd) and trials with pheromones of the olive moth, *prays*, *prays oleae* (Bern,) in crete, report for 1977. COPR unpublished report Natural Resources Institute, chatham, Kent, UK.
- Campio, D.G. and Jones, K.A. (1991). Pheromones and microbial insecticides for the control of cotton pests. Proceedings. 50th plenary Meeting of the International cotton Advisory Committee, Antalya, Turkey, September 1991.
- Carlton,B.C.; Gawron-Burke, C. and Johnson T.B. (1990). Exploiting the genetic diversity of *Bacillus thuringiensis* for the ceration of new bioinsecitides. Proceedings Vth International Colloquium on Invertebrate pathology and Microbial control, Adelaide, Australia 20-24 August 1990, 18-22.

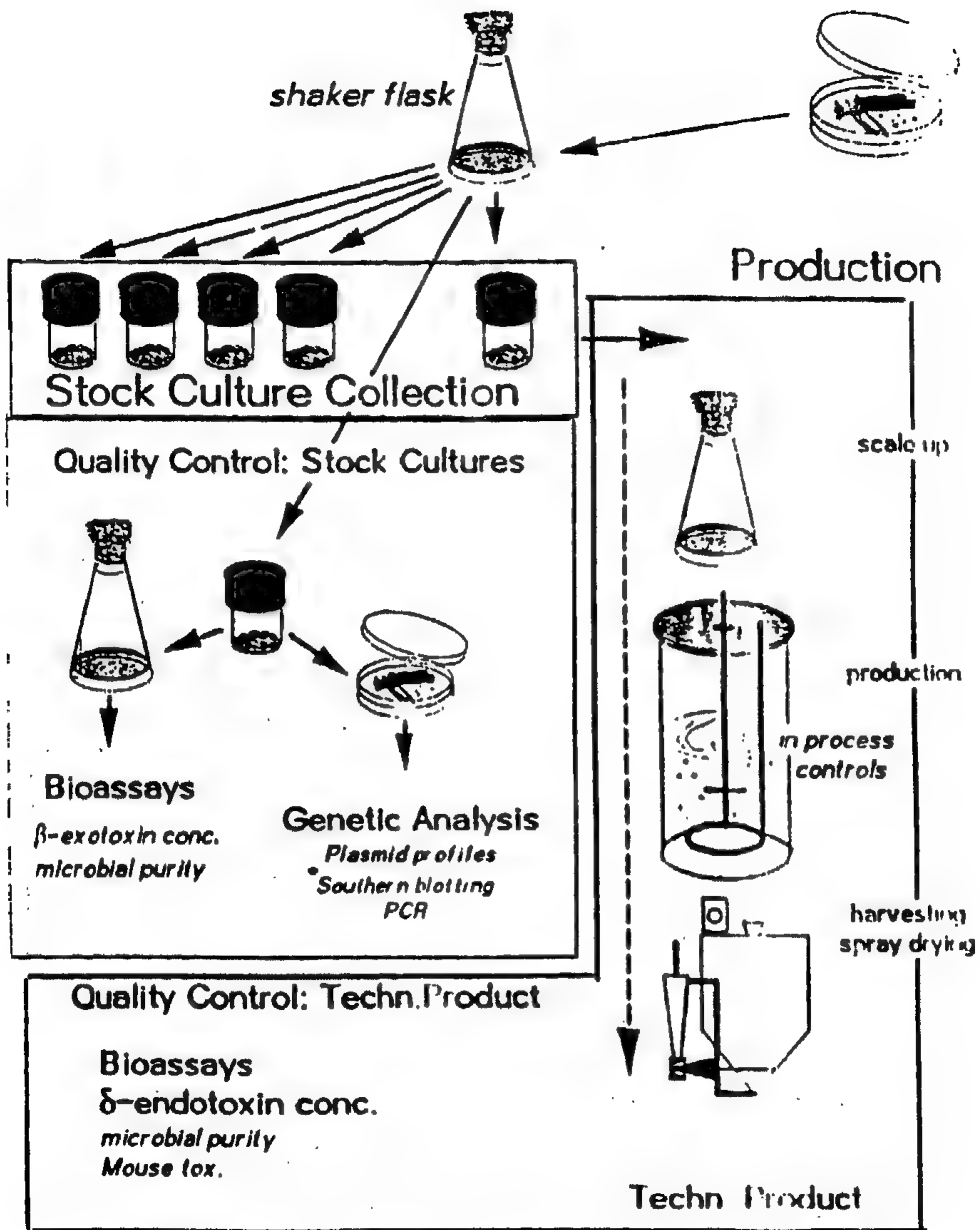
- Coffee, R.A. (1979). Electrodynamic energy – a new approach to pesticide application. Proceedings 1979 British Crop protection conference, pests and Diseases, 777-789.
- Falcon, L.A. (1971). Use of bacteria for microbial control. In H.D. Burges & N.W. Hussey (eds) Microbial control of Insects and Mites 67-95. Academic press, London.
- Federici, B.A. (1990). Bright horizons for invertebrate pathology. Proceedings Vth International colloquium on Invertebrate pathology and Microbial control, Adelaide, Australia 20-24 August 1990, 5-9.
- Gelernter, W.D. (1990). MUPTM bioinsecticide ; abioengineered, bioencapsulated product for control of lepidopteran larvae. Proceedings Vth international lepidopteran colloquium on invertebrate pathology and Microbial control, Adelaide, Australia 20-24 August 1990-14.
- Goodyear, R. (1978). Identification of armyworm, cutworm, budworm and looper caterpillar pests. A.G. Bulletin 2, Department of Agriculture, New south Wales, Australia.
- Heimpler, A.M. and Angus, T.A. (1963). Diseases caused by certain sporeforming bacteria. In E.A. Steinhaus (ed) insect pathology : an advanced Treatise. 2, 12-73 Academic press, London.
- Hill, D.S. (1983). Agricultural insect pests of the tropics and their control, 2nd edition cambridge university press.
- Hosny, M.M. (1980). The control of cotton pests in Egypt. Outlook in Agriculture 10. 204-205.
- Jones, K.A. (1990). Control of *spodoptera littoralis* in crete Egypt with NPV. In J.E. casida (ed) pesticides and Alternatives . innovative chemical and Biological Approaches to pest control, 131-142. Elsevier, Amsterdam.

- Khalifa, A.; Iss-Hak, R.R. and foda, M.E. (1982). Vertical and horizontal distribution of the Egyptian cotton leafworm masses in cotton fields in Egypt. Research Bulletin No. 1749, faculty of Agriculture, Ain shams university, cairo, Egypt.
- Krieg, A.; Huger, A.M.; Langenbruch, G.A. and schnetter, W. (1983) *Bacillus thuringiensis*. J.Apple. Entom., 96, 500-508.
- Mathews, G.A. (1982). Prospects of better deposition deposition of microbial pesticides using electrostatic sprayers. Proceedings IIIrd international colloquium on invertebrate pathology, Brighton UK, september, 1982, 55-59.
- Mowlan. M.D. (1973). Spraying cotton with ULV hand machines SPAN, 16 127-128.
- Pearson, E.O. (1958). The insect pests of cotton in tropical africa. CAB, London.
- Topper, C.P. (1984). Report on the research and development of nuclear polyhedrosis virus of *spodoptera littoralis* (Boised.), 1979-1981, 2, ODA, London.
- Young III, S.Y. and yearian, W.C. (1986). Formulation and application of baculoviruses vol. II, Practical Application for insect control., 157-179.

٣- استخدام الباسيلليس تورينجيسيز في إيطاليا: الوضع الراهن.

من مقالة للباحث E-pasqualini في معهد الحشرات في "Guido Grandi" University of Bologna via filippo Re, 6-40126-Bologna, Italy. ذكر انه قد سمح باستخدام Bt في إيطاليا في اوائل ١٩٨٧ بناء على تحضيرات مسجلة فعلا تسمى Bt لتحت النوع كورستاكي (B.T.i) والتي تستخدم على التوالي ضد العديد من أنواع حشرات حرشفية وثنائية الأجنحة. قبل وبعد تسجيل هذه المستحضرات تم اجراء العديد من التجارب وما زالت تجري تجارب اضافيه على B.t.k. لقد اجريت تجارب حقلية موسعة لتقييم كفاءة المستحضرات بالمقارنة بالمنتجات الاضافية مثل ازيثوفوس - ميثيل والكونيالفوس. لقد اجري عدد من التجارب كذلك على الخضراوات والاشجار لتحديد الجرعة والتوقيت المناسبين. لقد أجريت هذه الدراسات في الجامعات والمعاهد البحثية الاخرى من خلال برامج عامة استهدفت تحقيق استراتيجيات خاصة للمكافحة المتكاملة والمستتيرة مع هدف تقليل الاعتماد على المبيدات الكيميائية.

بكتريا B.t.k مسجلة في الوقت الراهن كمنتج لمكافحة العديد من انواع حشرات حرشفية الاجنحة الضارة التي تصيب التفاح والخوخ والعنب والكرنبو اللفت والذرة واشجار الغابات (جدول ٤-١٢). هناك توصيات باستخدام هذه البكتريا في حماية المزروعات الاخرى مثل الفراولة والفلفل الاسود والطماطم وغيرها بالرغم من ان التسجيل الرسمي لهذه الاستخدامات مازالت معلقة. في السنوات الحديثة استخدمت B.t.k بكثافة في مكافحة الاصابات ببرقات Hyfantria (Lep.Arctiidat) التي تهاجم مدي واسع من اشجار ومحاصيل الفاكهة ونباتات الزينة. لقد اجريت العديد من البحوث لتأكيد الكفاءة ضد بعض انواع حشرات حرشفية الاجنحة على الكيوي. واشجار المطاط الاستهلاك الحالي من بكتريا B.t.k في إيطاليا بناء على بيانات ١٩٩١ من شركات الكيمياءات وصل حوالى ٣٥-٤٠ طن وزعت على النحو التالي: ٣٥-٤٠% على اشجار الفواكه، ٥٥-٦٠% على العنب، ٥-٨% على محاصيل الخضر (جدول ٤-١٣) الكمية التي استخدمت على اشجار الغابات غير معروفة ولكن يفترض ان تكون قليلة. معظم استهلاك B.t.k حوالى ٨٠% يحدث في المناطق الشمالية من سردينيا. توجد انواع B.t.k متاحة في الاسواق الايطالية مثل توروسين HP' باكتوسيين، باكتوسيد، ديبيل، بيوبيست، فوري،.... الخ. المبيعات الشاملة وصلت في المتوسط ٢٣ دولار/ كجم للفلاحين وتقدر باجمالى ٨٠٠,٠٠٠ دولار تمثل حوالى او % من السوق الكلى للمبيدات في إيطاليا.



إختبارات الكشف عن جودة سلالات الباسيلليس ثورنجنسيس بعد الإنتاج

جدول (٤-١٢) : المحاصيل التي مسجل لمكافحة افاتها بكتريا Bt ضد العديد من الآفات الضارة و الجرعات من المواد الفعالة a-I (١٦٠٠٠ وحدة دولية) جم/هكتار

| Crops | Main Harmfull species | G /h |
|----------|-----------------------------|---------|
| Cabbage | Pieris brassicae | 30-75 |
| Radish | Pieris rapae | 30-75 |
| Mazie | Ostrinia nubilalis | 100-150 |
| Apple | Pandemis cerasana | 100-150 |
| And | Pandemis heparana | 100-150 |
| | Archips podanus | 100-150 |
| Pear | Argyrotaenia pulchellana | 100-150 |
| | Adoxophyes reticulana | 100-150 |
| Vineyard | Lobesia botrana | 100-150 |
| | Eupoecilia ambiguella | 100-150 |
| | Thaumetopoea pytiocampa | 50-100 |
| forestry | Thaumetopoea processionaria | 50-100 |
| | Lymantria dispar | 50-100 |

جدول (٤-١٣) : البيانات عن B.t.k. المستخدم في ايطاليا (١٩٩١).

| | | |
|----------------------|---|-----------------------------|
| أشجار الفاكهة ٣٥-٤٠% | ← | الاستهلاك الكلي ٣٥-٤٠ طن |
| بساتين العنب ٥٥-٦٠% | ← | |
| محاصيل أخرى ٥-١٠% | ← | |

لقد تم تقسيم بكتريا B.t.k من ضمن المبيدات مع أقل درجة من السمية ولذلك ليست هناك حاجة لتحديد أقصى حد مسموح به من المخلفات في الغذاء. من أهم ملامح هذه المنتجات ما يعرف "بفترة التحليل decay period" وهي الفترة التي تنقضي ما بين آخر معاملة والحصاد وقد قدرت بثلاثة أيام. المركب اختياري لمفصليات الأرجل النافعة ولم تسجيل أية حالات مقاومة حتى الآن Resistance في ايطاليا حتى الآن (جدول ٤-١٤). الأسباب الرئيسية لمحدودية الاستخدام الفعلي تتمثل في : ندرة تحقيق الفاعلية مع درجات الحرارة الواطئة، عدم انتظام و ثبات وسهولة إزالتها بواسطة الأمطار والحاجة في

بعض الاحيان لاضافه السكر لتحسين للاداء وصعوبة تحديد الوقت المناسب وقصر فترة الفعل (حوالي اسبوع). السبب الوحيد الذي يسود كل الاسباب في تحديد الاستخدام يحتمل ان يكون عامل التكلفة والذي مازال عاليا حتي الان بالمقارنة بالمبيدات الحشرية التقليدية.

جدول (٤-١٤) : الخصائص الاساسية لتسجيل B.t.k في ايطاليا.

| | |
|--|----------------------------|
| ١- أقل قسم في السمية | بكتريا B.t.k في القانون |
| ٢- لا يوجد مستوي أقصى مسموح به من المخلفات في الغذاء | |
| ٣- فترة التحلل : ٣ أيام | |

تجهيزات البكتريا B.t.i. تستخدم لمكافحة الحشرات لاسباب مختلفة بالنظر الى البعوض يستخدم بهدف تقليل ازعاج الحشرات للفلاحين والسائحين كما يستخدم لحماية الحيوانات خاصة ضد حشرات رتبة الهاموش Simulidae . في الوقت الراهن ثم تسجيل العديد من B.t.i. في مستحضرات مثل فيكتوباك، تكنار، باكتيس، تورباك، باكتيموس وغيرها. الاستهلاك الشامل للمستحضرات المحتوية على 150 U.I.T.I. قدر بحوالي ٢٠٠٠ كجم (بيانات ١٩٩١) استخدام هذه المنتجات بدعم بواسطة الوكالات الحكومية ومن الناحية العملية يقيد استخدامها في شمال شرق ايطاليا وسردينيا.

مازالت تجري العديد من التجارب الحقلية على مستحضرات البكتريا Bt على نطاق واسع ومكثف للتعرف بين المستحضرات المختلفة وتحديد الجرعات الفعالة والتوقيت المناسب للاستخدام والوصول الي مستحضرات اكثر ثباتا. تجري تجارب واسعة على تحت انواع من الباسيلليس مثل Tenebrionis ضد حشرات غمدية الاجنحة. خلاصة القول انه يمكن استخدام منتجات لمركبات Bt لمكافحة العديد من الحشرات الضارة مع المحافظة على البيئة وتحسين الفاعلية والاداء وتحقيق الاختيارية. ليكن معاوما ومتفقا عليه ان التوسع في استخدام هذه المستحضرات البكتيرية مرهونا بإمكانية تقليل التكاليف ومرة اخري لم يذكر كاتب المقال أي اشارة او معلومة تشير ولو من بعيد عن تأثير بكتريا الباسيلليس بصرف النظر عن تحت النوع على بيض الحشرات فهي سموم معدية لابد ان تؤكل بواسطة الحشرة وتصل الى المعدة حتي تحدث التأثير.....

٤- دور وكفاءة الباسيلليس تورينجينسيس في الادارة المتكاملة للآفات في الدول النامية. من مقال للدكتور S.Barbosa خبير الادارة المتكاملة للآفات منظمة في الاغذية و الزراعة FAO التابعة للأمم المتحدة. لقد تغيرت الزراعة بشكل ملحوظ خلال الاربعين سنة الاخيرة من اجراء تتابع استخدام الكيماويات المخلقة لمكافحة الآفات على المحاصيل المختلفة بداية باكتشاف الددت عام ١٩٣٩ والذي تم الكشف عن فعاليته ضد الحشرات بعد سنوات قليلة من الاكتشاف. من ١٩٤٣ وحتى ١٩٨٥ قفز استهلاك العالم من المبيدات من اقل من ٣٠ ألف طن متري الى ٣ مليون طن متري عام ١٩٨٥ (Prokopy ١٩٨٨). يجب الا ننكر ان مكافحة الكيماوية ساهمت بشكل معنوي في تحقيق زيادة سريعة وثابتة في الانتاج الزراعي حول العالم ولكننا يجب ان نشير الى انها و في نفس الوقت ساهمت بشكل سريع جدا في تقليل صحة النباتات (Brader ١٩٩١) بسبب تتابع الاعتماد المكثف على مكافحة الكيماوية اصبحت الزراعة الحديثة معرضة اجباريا بشكل شديد لاحداث تأثيرات جانبية غير مرغوبة على صحة الانسان والبيئة. لقد قدر مايقرب من ٢٥ مليون عامل زراعي في الدول النامية يتسممون كل عام بالمبيدات (Jeyaratnam ١٩٩٠). من جهة اخري فان تأثير المبيدات على البيئة بالرغم من الحالات الموثقة مازالت تعاني من التقويم الخاطئ. فيما بين مبيدات الآفات تعتبر المبيدات الحشرية في اكثر المجموعات اهمية عندما تؤخذ صحة الانسان والبيئة في الاعتبار. من بين الاثني عشر مركب وما يطلق عليها. الدسنة القذرة dirty dozen المدونة (pan ١٩٩١) وجدت عشرة منها مبيدات حشرية.

هناك تأثيرين اخرين جانبيين لاستخدام المبيدات يحدثان اكثر مع المبيدات الحشرية. هذه التأثيرات تشمل الفوران الوبائي للاصابة/معاودة ظهور الافة بسبب القضاء على الطفيليات والمفترسات الطبيعية وانتخاب الآفات المقاومة لفعل المبيدات. لقد اشار (Georghiou and lagunes ١٩٩١) ان من اول الاكتشاف الخطير كظاهرة المقاومة Resistance عام ١٩١٤ وحتى ١٩٨٩ اظهر ٥٠٤ نوع من مفصليات الارجل مقاومة للمجموعات المختلفة من المبيدات الحشرية / مبيدات الاكاروسات ، ٢٨٣ من بينها آفات زراعية. تبعا للعالم Luilcox واخرون (١٩٨٦) تم انفاق مايزيد عن ٣ بليون دولار امريكي على مستوي العالم كل سنة لمكافحة الآفات الحشرية. من السخرية انه بالرغم من ان استخدام المبيدات على مستوي العالم يزداد دائما فان الفقد الذي تسببه الآفات لم يتناقص منذ الحرب العالمية الثانية. حتي في الدول النامية فان صحة النباتات تدهورت. في امريكا على سبيل المثال فان الفقد المحصولي السنوي بسبب الحشرات زاد من ٧% في

الأربعينات إلى ١٣% في الثمانينات (Holden ١٩٨٩). الآفات الحشرية من رتبة حرشفية الأجنحة تكون المجموعة الأكبر من بين كل الآفات الزراعية ومعظمها آفات تظهر بواسطة الاستخدام المكثف لمبيدات الآفات. حشرات حرشفية الأجنحة كذلك تنصدر قائمة الأنواع الحشرية التي تكون أفرادها مقاومة لفعل المبيدات الحشرية من بين كل مفصليات الأرجل حيث تمثل ٢٦% من المجموع الكلي (جورجيو ولانجونس ١٩٩١). لحسن الحظ فإن بكتريا الباسيلليس تورينجينسيس اكتشفت وأظهرت فاعلية ملحوظة ضد هذه المجموعة من الآفات الحشرية الزراعية. بالرغم من الكشف عن تطور ظاهرة المقاومة للباسيلليس في ثلاثة أنواع من حرشفية الأجنحة وهي فراشة الدقيق الهندية والفراشة ذات الظهر الماسي وفراشة الماس وما أحدثه ذلك من إحباط في تشجيع وتدعيم استخدام هذه البكتريا في مكافحة الآفات إلا أنها مازالت من أفضل الخيارات في العديد من برامج الإدارة المتكاملة للآفات في المواقع التي تمثل حرشفيات الأجنحة مكانا بارزا بين معقد الآفات. في الحقيقة فإن مبيعات بكتريا Bt تضاعفت منذ ١٩٨٧ وأشارت أكثر التقديرات تحفظا عن حجم السوق ١٩٩٥ ما بين ٣٠٠ مليون دولار و حتى ٥٠٠ مليون دولار (Anon ١٩٩١).

الإدارة المتكاملة للآفات (IPM) Integrated pest Management

لجنة خبراء الفاو FAO عن الإدارة المتكاملة للآفات IPM (والتي كانت تختصر في السابق IPC المكافحة المتكاملة للآفات) عرفت IPM كنظام لإدارة التعامل مع الآفات من مفهوم التواجد البيئي ومجموع الآفات باستخدام كل الطرق المناسبة والأساليب في أسلوب متوافق بقدر الامكان والحفاظ على مجموع الآفات عند مستويات أقل من تلك التي تسبب ضرر (FAO ١٩٦٧). الآن وبعد ٢٥ سنة من التعريف الرسمي الذي اعلنته FAO عن الإدارة المتكاملة للآفات IPM فإن عدد البرامج الناجحة مازالت قليلة للغاية. بالرغم من التنبيه والحيطة التي دعت للحاجة إلى تطوير طرق بديلة غير كيميائية لمكافحة الآفات في الزراعة إلا أنه حدثت زيادة مضطردة في استخدام المبيدات في الدول النامية. للإنصاف نقول إن الدول النامية قد فعلت وعضدت القوانين والتشريعات التي استهدفت تقليل استخدام المبيدات في الزراعة بسبب التأثيرات البيئية. من جهة أخرى فإن دول العالم الثالث في محاولاتها المستميتة والكفاح في سبيل تطوير الزراعة والاقتصاد ليست لديها مقومات حماية البيئة بحيث تضعها في أوائل أولياتها ومن ثم فهي تستخدم أي مبيدات تحصل عليها. لقد ظهر هذا الوضع في العديد من الحالات التي حدثت فيها ثورات في

برامج تطوير الزراعة التي اضطلعت بمهام تحقيق الثورة الخضراء ووضع النماذج ذات المدخلات العالية في الزراعة.

لحسن الحظ توجد امثلة قليلة عن البرامج الناجحة للإدارة المتكاملة للآفات IPM حيث امكن من خلالها تقليل كميات المبيدات التي كانت تستخدم في السابق وفي نفس الوقت الحفاظ على الانتاجية المحصولية العالية. برامج IPM في الارز في اسيا و IPM في فول الصويا في امريكا الجنوبية تعطي امثلة جيدة تشجع على عمل الشيء نفسه مع محاصيل ومناطق اخري والتي مازالت الزراعة والانتاج الزراعي تعتمد على الكيماويات في مكافحة الآفات. هذين البرنامجين خير دليل على ان IPM هي افضل الاقترابات التي تضمن الحفاظ على صحة النبات وتكاليف قليلة مع تعظيم ما يعرف بالزراعة المستدامة والمتواصلة بما يحافظ على صحة النبات والحفاظ على البيئة.

لكي نحقق قيام الفلاحين انفسهم بممارسة الادارة المتكاملة للآفات IPM عمليا نحتاج لتسهيل هذه المهمة عليهم. بالطبع فان هذا الاقتراب يحتاج لاساسيات بيئية وتقنية ولكن مع أي مشكلة متعلقة بالآفات توجد حزمة كافية من المعلومات تمكن من بدأ برنامج IPM صلب وجيد. كذلك يتم الحصول على معلومات جديدة من البحوث الجارية والمنتوية تصلح للتطبيق على مستوى الحقل ومن مستوي الحقل ومن ثم تصبح وسيلة جديدة في ممارسات عملية IPM.

معظم برامج IPM الناجحة بدأت كوسيلة للهروب مما يطلق عليه طاحونة المبيدات pesticide treadmill عندما تحصل الى حدود الخيارات الكيماوية مع كل التتابعات والتأثيرات الجانبية التي ذكرت اعلاه بالطبع فانه مع المنع الجزئي او الكلي للضغوط بالمبيدات من النظام البيئي الزراعي فان الاعداء الطبيعية للآفات الحشرية تصبح قادرة على العودة وإعادة التوازن الذي كان موجوداً بين الافة وبينها فيما قبل الافراط في استخدام المبيدات. من افضل الامثلة عن هذه الظاهرة ماحدث في النظام البيئي الزراعي في حقول الارز في اسيا. حيث يمثل فاقد النباتات العيني *Nilaparvata lugens* اكثر الآفات خطورة واضراراً في برامج تكثيف زراعة الارز بسبب الاستخدام المكثف للمبيدات الحشرية. لقد لوحظ ان العناكب تحافظ على اعداد الحشرة وقد كانت المبيدات الحشرية عديمة الجدوي ضد الحشرة ولكنها شديدة الفتك وقتل العناكب (Kenmore 1980). لقد تباكد ان كل الاصابات البوبائية من الحشرة والتي حدثت في اسيا كانت تعود الى استخدام المبيدات واسعة التأثير. هناك حالات كثيرة تحدث فيها انقلابات من حشرات غير ذات اهمية اقتصادية الى آفات خطيرة بسبب القضاء على الاعداء الطبيعية. حيث تقلل المبيدات

من المعروف الآن ان برامج IPM الناجحة لا تختلف في الاساسيات الثلاثة الشائعة فيها جميعا وهي : نمو نبات صحي ، الحفاظ وصيانة وزيادة الكائنات النافعة التي توجد طبيعيا في النظم البيئية الزراعية ، استخدام المبيدات الاختيارية فقط عند الوصول الى الحد الاقتصادي للضرر. بالطبع هناك مواقف تحتم التدخل بالمبيدات الحشرية كاحد مدخلات برامج IPM . هذه هي الحالة في نمو القطن حيث ان الاصناف تكون حساسة جدا للاصابة بالحشرات وعندما يكون النظام الشامل معتمدا على مكافحة الكيمائية للآفات. في هذه الظروف فان المكافحة بالكيمائيات تحت الاشراف الدقيق بناء على الحدود الحرجة للضرر قد تصبح الخطوة الهامة في تطوير برنامج IPM . بعض التوصيات العامة البسيطة مثل اتلاف وتحطيم مخلفات النباتات ووضع توار يخ متجانسة للزراعة وتأخير اول رشة بالمبيدات ما امكن واستخدام المبيدات المتخصصة عند الحاجة قد تكون عصب برنامج IPM على المدى الطويل اذا نفذ بشكل صحيح ومتوافق.

التحديات والعقبات التي تعترض تنفيذ الادارة المتكاملة للآفات:

هناك الكثير من التوجهات عن اسباب عدم تحقيق نجاح مع الكثير من برامج IPM او عدم ادخال هذه البرامج بالشكل الكافي الذي كان متوقعا في الدول النامية اخذه في الاعتبار الفوائد الاقتصادية والاجتماعية والبيئية التي اعلن عنها هذا البرنامج منذ ربع قرن مضى. يمكن وضع هذه الاسباب في ثلاثة مراتب هي الاقتصادية والاجتماعية والبحثية كما في الاستعراض التالي:

١- الاسباب الاقتصادية: لقد كان الكل حريصا على توفير المبيدات للمزارعين بتكاليف منخفضة ومن ثم لا يوفر الفلاحين اية مصاريف وتكاليف من خلال توفير عدد مرات استخدام المبيدات. توجد صور عديدة للدعم المباشر وغير المباشر للمبيدات وكذلك وضع منح للمبيدات وغيرها من التقنيات التي تزيل اية حوافز لادخال الادارة المتكاملة للآفات IPM لجعل الموقف اكثر سوءا فان المبيدات تسوق وترقي بشكل اقوي من قبل الحكومات و القطاع الخاص حيث الكل يسعى لتحقيق الفوائد. من جهة اخري فان تشجيع وادخال برامج IPM متروكة للأفراد بشكل جيد دون اية مصادر دعم لادخال هذه البرامج. الفلاحين لم يسمعوا عن IPM ولكنهم امام فيضان من الدعاية عن المبيدات.

٢- الاسباب الاجتماعية : الفلاحين في الدول النامية غير منظمين وليس لهم اية قوة سياسية. لا تستخدم الفلاحون في تحقيق مطالب حكومية او في الاتجاه الاخر حيث لا

يُضغَط الفلاحين على الحكومة للحصول على مكاسب خاصة بتطوير المناطق الريفية وتحسين ظروف المعيشة. موظفي الحكومة المسئولين عن الخدمات الزراعية والارشاد والبحوث يحصلون على مرتبات متدنية ويعيشون في حالة من الثبات او الخنوع العاطفي كما يعانون من نقص او في إمكانيات لا تمكنهم من احداث اية تغييرات في التكنولوجيا الزراعية للعملاء. على العكس من ذلك فان بائعي المبيدات يدفعون جيّدا ولديهم كل وسائل التحفيز لبيع مبيدات اكثر واكثر.

٣- الاسباب البحثية: الجامعات الزراعية في الدول النامية تعاني من نقص النواحي الاساسية لتجهيز محترّفين لتحمل اعباء المستقبل. البحوث الزراعية والارشاد الزراعي تعاني من نقص الكوادر الفنية والعلمية وكذلك من نقص الامكانيات والميزانيات التي تمكنهم من تحقيق المهام الموكلة اليهم خاصة مايتعلق بتغيير انماط الزراعة وتحقيق ثبات في السوق الزراعي . هناك تضارب في الاهتمامات عندما يراد ادخال تكنولوجيات حديثة مثل IPM والتي سوف تقلل حتما من مبيعات المبيدات. على المستوى السياسي لا يوجد مناخ او بيئة تشجع تطوير برامج IPM .

بالرغم من هذه التحديات فان التأثيرات الجانبية من جراء الاستخدام المكثف للمبيدات على صحة الانسان والبيئة خلقت تحذير وتوجهات للدول النامية تؤكد الحاجة لتطوير برامج IPM كما ذكر سابقا فانه توجد معلومات كثيرة عن الطرق والوسائل البديلة لمكافحة الافات على مختلف المحاصيل في الدول المختلفة. ما نحن في احتياج اليه ضرورة اشراك الفلاحين من البداية وجعلهم يترسسون في تطبيق برامج IPM مع قناعة كاملة لديهم من ان IPM اكثر فائدة وعائدات عن طرق مكافحة الكيمائية ذات الجانب الواحد وجعلها اي IPM اكثر بساطة.

دور الباسيلليس تورينجيسيز في برامج IPM في الدول النامية:

لقد سبق القول ان برقات الحشرات من رتبة حرشفية الاجنحة تكون مجموعة الافات الزراعية الاكثر اهمية. لقد تأكد ان هذه الحشرات عندها حساسية كبيرة لتكوين مقاومة ضد المبيدات الحشرية ومعاودة الاصابات الوبائية وكذلك تحولها من افات ثانوية الى افات رئيسية. الجدول (٤-١٥) يشمل قائمة من الحشرات الهامة من رتبة حرشفية الاجنحة التي فحصت وتأكد امكانية ان تكون هدف لبكتريا B.t. داخل اطار نظم الادارة المتكاملة للافات IPM اذا استعرضنا اهم الافات الهامة في الزراعة على مستوى العالم نجد على راس القائمة ديدان اللوز *Heliothis Helicoverpa* والفراشة ذات الظهر

الماسي (DBM). الاولى معقدة حقيقة حيث تشمل جنسان واربعة انواع في غاية الاهمية كحشرات ملتهمة ولها مدي واسع من المحاصيل التي تهاجمها مثل القطن والذرة. من جهة اخرى فان P.xylostella من انواع الحشرات محدودة العوائل مع عدد محدود من العوائل خاصة الصليبيات.

أ- *Heliothis /Helicoverpa* : لقد اشار جورجيو ولاجونس ١١٨ حالة من المقاومة لفعل المبيدات الحشرية في خمسة انواع على مستوى العالم تغطي ستة مجاميع من المبيدات وهي الددت، السيكلودنيات، الفوسفورية العضوية، الكاربامات، البيرثريودز المخلقة وغيرها والتي تمثل ٢٠% من كل الحالات المسجلة في رتبة حرشفية الاجنحة. معظم الحالات المسجلة عن المقاومة داخل هذا المعقد من الافات كان في افات القطن خاصة بديدان اللوز كذلك فان ظواهر معاودة الاصابة الوبائية وفوران الافات الثانوية جاءت من حقول القطن. على مستوى العالم فان الاستخدام المكثف للمبيدات في حقول القطن جعلت من ديدان اللوز حشرات ذات اهمية خاصة من منطلق نقطتان : الاولى جعلها افات رئيسية بعد ان كانت ثانوية كما حدث في امريكا وافريقيا الوسطى حيث ادي الاستخدام الكثيف للمبيدات الحشرية واسعة الانتشار (توكسافين - ددت ، باراثيون وغيرها) في اول الموسم لمكافحة سوسة اللوز الى ظهور وبائي لديدان اللوز بسبب القضاء على الاعداء الطبيعية من طفيليات ومفترسات لقد حدث نفس الموقف في السواند في اواخر السبعينات (Eveleens ١٩٨٣) وهو ما يحدث اليوم في اسيا. النقطة الثانية ظهور افات رئيسية من الثانوية بعد الاستخدام المكثف للمبيدات في مكافحة ديدان اللوز الحديثة الظهور كما سبق القول وهي عملية تدوير او دائرة recycling process . من الامور المسلم بها في الوقت الراهن من قبل ولكنها تحولت واصبحت من الافات الخطيرة بعد الاستخدام المكثف للمبيدات الحشرية واسعة الانتشار والمجالات بما فيها البيرثريودز المخلقة قصيرة الاجل.

القطن معروف عنه انه البطل الفاتر من بين المحاصيل عندما تؤخذ استخدامات المبيدات في الاعتبار كمعيار للمقارنة. في بعض الدول النامية وبالنظر الى الاسس الاقتصادية لانتاج القطن يكون الموقف اكثر خطورة. باكستان على سبيل المثال تستقطع ٨٠% من كل استهلاك المبيدات الزراعية في مكافحة افات القطن. المبيدات الحيوية ضد معقد ديدان اللوز لا يبدو انها معقل الحل للمشكلة على المدى الطويل لهذه الافة ولكنها قد تخلصنا من العديد من المشاكل التي تسببت عن الاستخدام المكثف والواسع للمبيدات الحشرية . لسوء الحظ فان بكتريا B.t. لم تثبت بالدليل القاطع فاعلية مرضية ضد هذه

المجموعة من الآفات الحشرية بالرغم من أحداثها لنسب موت عالية على الحشرات في الاختبارات المعملية.

لقد تم قبول ان اليرقات الصغيرة تقضي وقت قصير جدا في التغذية على اطراف النباتات قبل ان تدفن نفسها في اللوز ومن ثم تكون فرصة ان تاكل البللورات و الجراثيم المرشوشة في المستحضر محدودة جدا. اذا لم نقوم بحل هذه المشكلة من خلال تجهيز مستحضرات افضل ووضع توقيت مناسب لاستخدام ورش بكتريا Bt او حتي تطوير سلالة من Bt اكثر عنفا ضد هذه الآفة فان فرص الاستخدام الفعال لمستحضرات Bt في حماية نباتات القطن من هذه الحشرة لاتكون جيدة على الاطلاق. حتي لو نجحنا في التغلب وحل كل المشاكل والعقبات والتحديات التي ذكرت قبلا و غيرها فان الفلاحين لن يقوموا باستخدام Bt الا اذا ثبت انها اكثر فاعلية وارخص من المبيدات الاخرى.

ب - الفراشة ذات الظهر الماسي *Plutella xylostella* : لقد اشار جورجيو ولاجونس (١٩٩١) الى حدوث ١١٠ حالة مقاومة في هذا النوع من الحشرات على مستوى العالم مع ستة مجاميع من المبيدات الحشرية خاصة معقد ديدان اللوز كما ذكر سابقا. من الاهمية القصوي عن مستقبل Bt في مكافحة هذه الآفة ما وجده Tabashnik وآخرون (١٩٩٠) و الذي اعلن من هاواي ولاول مرة انه تكونت سلالات عالية المقاومة من الحشرة DBM ضد المستحضرات التجارية من بكتريا Bt كورستاكي . بعد ذلك اصبح من الواضح انه حتي المبيدات الحيوية يجب ان تستخدم بعقلانية حتي نتجنب حالات المقاومة وهذا ينعكس على الحفاظ على وسائل المكافحة فعالة لاطول فترة ممكنة. الفراشة ذات الظهر الماسي DBM آفة عالمية وقد تاكد ان تطور المقاومة ضد المبيدات دفعت الفلاحين لزيادة الجرعات وزيادة عدد الرشاشات. لقد ادي هذا الوضع الى زيادة المقاومة اكثر و حدوث مستويات غير مقبولة من مخلفات المبيدات في الكرنب والبروكلي والقرنبيط وغيرها من الصليبيات.

جدول (٤-١٥) : افات حرشفية الاجنحة الزراعية ذات الاهمية الدولية كاهداف لاستخدامات بكتريا B.t.

| Common Name | Scientific Name | Number of Reported cases of Insecticide Resistance* |
|----------------------------|--------------------------|---|
| Diamondback moth | Plutella xylostella | 110 |
| Imported cabbageworm | Pieris rapae | 16 |
| Cabbage looper | Trichoplusia ni | 46 |
| Lesser armworm | Spodoptera exigua | 14 |
| Cabbage webworm | Hellual undalis | - |
| Latin American cabbageworm | Ascia monuste orseis | - |
| Cabbage moth | Crocidolomia binotalis | - |
| COTTON | | |
| American bollworm | Helicoverpa armigera | 30 |
| Cotton bollworm | Helicoverpa zea | 35 |
| Tobacco budworm | Heliothis virescens | 52 |
| Spotted bollworm | Earias insulana | - |
| Spiny bollworm | Pectinophora gossypiella | 4 |
| Pink bollworm | Diparopsis castanea | 4 |
| Red bollworm | Alabama argillacea | - |
| Cotton leafworm | Spodoptera littoralis | 9 |
| Cotton leafworm | S. exigua | 33 |
| Lesser armworm | S. frugiperda | 14 |
| Black armyworm | S. Litura | 14 |
| Fall armyworm | Agrotis ipsilon | 9 |
| Black cutworm | A.segetum | 6 |
| Cotton leaf perforator | Bucculatrix thurberiella | - |
| | | 20 |
| FRUITS | | |
| Codling moth (apples) | Cydia pomonella | 39 |
| Grape moth | Lobesia botrana | 1 |
| Oriental fruit moth | Grapholota molesta | 3 |
| GRAIN LEGUMES | | |
| Velvetbean caterpillar | Anticarsia gemmatilis | - |
| Soybean looper | Pseudoplusia includens | 6 |
| American bollworm | Helicoverpa armigera | 30 |
| Bean pod borer (Mung moth) | Maruca testulalis | - |

تابع جدول (١٥-٤) : افات حرشفية الاجنحة الزراعية ذات الالهية الدولية كاهداف لاستخدامات بكتريا B.t.

| | | |
|------------------------|--------------------------|----|
| JUTE AND KENAF | Anomis sabulifera | - |
| Jute semilooper | Diacrisia obliqua | - |
| Jute hairy caterpillar | spodoptera exigua | - |
| Indigo caterpillar | | - |
| MAIZE | Spodotera exempta | 14 |
| African armworm | S. frugiperda | - |
| Black armworm | Ostrinia nubilalis | 2 |
| European cornborer | O. furnacalis | - |
| Asiatic cornborer | Chilo partellus | - |
| Spotted stalk | Busseola fusca | - |
| Maize stalk borer | Helicoverpa zea | 35 |
| Corn armworm | H. armigera | 30 |
| American bollworm | Sesamia calamistis | |
| Pink stalk borer | | |
| RICE | | |
| Rice stem borer | Chilo suppressalis | - |
| Rice leaf folder | Cnaphalocrocis medinalis | 13 |
| Small rice borer | Scirpophage gilviberbis | 1 |
| White rice borer | S. nivella | - |
| Yellow rice borer | Tryporiza incertulas | - |
| | | - |
| TOMATOES | | |
| (and other solanceae) | | |
| Tomato fruitworm | Helicoverpa zea | 35 |
| American bollworm | H. armigera | 30 |
| Lesser armworm | Spodoptera exigua | 14 |
| Tomato pinworm | Keiferia lycopersicella | - |
| Tomato leafminer | Scrobipalpula absoluta | 1 |
| Brinjal borer South | Leucinodes orbonalis | - |
| American fruitworm | Neoleucindes elegantalis | - |
| Potato tubermoth | Phithorimaea operculella | 11 |

*From Georgiou and Lagunes. 1991

لقد أظهر استخدام مستحضرات B.t. في مكافحة يرقات DBM فاعلية جيدة في كثير من الأماكن التي استخدمت فيها وما زالت تعطي المثل عن الجدوى الحقيقية للاعتماد على المبيدات الميكروبية في مكافحة الآفات الزراعية. البكتريا تقتل الافة ولكنها لا تضر بالاعداء الطبيعية او تطردها ولا تحدث اية اضرار على عمال الرش ولا تترك مخلفات سامة على المنتجات الزراعية كما لا تضر بالبيئة. لسوء الحظ فان المبيدات الميكروبية عالية التكلفة بالمقارنة بالمبيدات الحشرية التقليدية. التقدير الحديث عن مقاومة DBM قد يكون بمثابة وقاية من الارتفاع نحو زيادة جرعات وعدد مرات استخدام المبيدات تجنباً لزيادة التكاليف واضطراد تطور المقاومة.

ج - افات اخرى من رتبة حرشفية الاجنحة: كما ذكر قبلاً يوجد العديد من انواع حشرات حرشفية الاجنحة تستجيب لبكتريا Bt في الصين كمثال فان المستحضرات المحلية للباسبيليس Bt تستخدم بانتظام ضد افات الوراق c.medinalis عندما يصل المجموع الى مستوى الحد الحرج للضرر في البرازيل اظهرت مستحضرات Bt نتائج جيدة ضد دودة ورق القطن ولكن الحاجة لاستخدام مبيدات اخرى جنباً الى جنب مع Bt في الحالات التي لا يكفي فيها الاعتماد على Bt منعت الفلاحين من التركيز والاعتماد على الباسبيليس . بالطبع فان تعظيم ادخال Bt في مكافحة الافات يتطلب استثمارات ضخمة وبحوث وتطوير وتحقيق ظروف مناسبة في محاصيل معينة قبل الوصول لنجاحات بارزة في هذا الشأن.

REFERENCES

- Adkisson, P.L. (1972) the integrated control of the insect pests of cotton. Proc. Tall timbers conf. On Ecological Animal control by Habitat Management, tall Timbers Res. Sta. (Tallahasse, FL) 4,175-188.
- Anon. (1991). Pesticide News. 12 the pesticides trust & pesticides News. London, p. 16.
- Barader, L. (1991) Global trends and constraints of integrated pest Management. Paper presented at the XII International plant protection congress. Rio de Janeiro. Brazil. 11-16 August 1991.
- Eveleens, K.G. (1983). Cotton insect control in the sudan Ghezira : analysis of a crisis. Crop protection . 2(3) 273-287.
- FAO (1967). Report of the first session of the FAO panel of Experts on integrated pest control. Rome. 19 pp.
- Georghiou, G.P. and lagunes, A.T. (1991). The occurrence of Resistance to pesticides in Arthropods. FAO. AGPP/MISC 91-1. 318 PP.
- Holden, c. (1989). Research news : entomologists wane as Insect wax. Science, 246, 754-757.
- Jeyaratnam, J. (1990). Acute pesticide poisoning : A major problem. World Health stat. Ort. 43, 139-144.
- Kenmore, P.E. (1980). Ecology and outbreaks of a tropical insect pest of the green revolution : the rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (stal). Ph. D. thesis, university of california, Berkeley (USA).
- Lim, G.S. (1990) Overview of vegetable IPM in Asia. FAO plant protection Bulletin 38 (2), 73-87.
- McGaughey, W.R. (1985). Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*. Science, 229, 193-195.

- McGaughey, W.R. and Beeman, R.W. (1988). Resistance to *Bacillus thuringiensis* in colonies of indianmeal moth and Almond moth (Lepidoptera : pyralidae). J.Econ. Entomol. 81, 28-33.
- Prokopy, R.J. (1988). Pest management in perspective. In innovations in pest Management. Stubridge, Mass., March 7-8, p. 7-11.
- Tabashnik, B.E. ; Cushing, N.I. ; fison N. and Johnson, M.V. (1990).Field development of resistance to *Bacillus thuringiensis* in the diamondback moth (Lepidoptera : Plutellidae). J. Econ. Entomol. 83, 1671-1676.
- Wilcox, D.R. ; Shivakumar, A.G. ; Melin, B.E. ; Miller, M.f. ; Beson, T.A. ; Shopp, C.W. ; Casuto, D. ; Gundling, G.J. ; Bolling, T.J. ; Spear B.B. and Fox, j.l. (1986). Genetic Engineering of Bioinsecticides. In M. Inouye & R. Sarma (eds). Protein Engineering : Applications in science, Medicine and Industry. Academic, Orlando, Flo, 395-413.

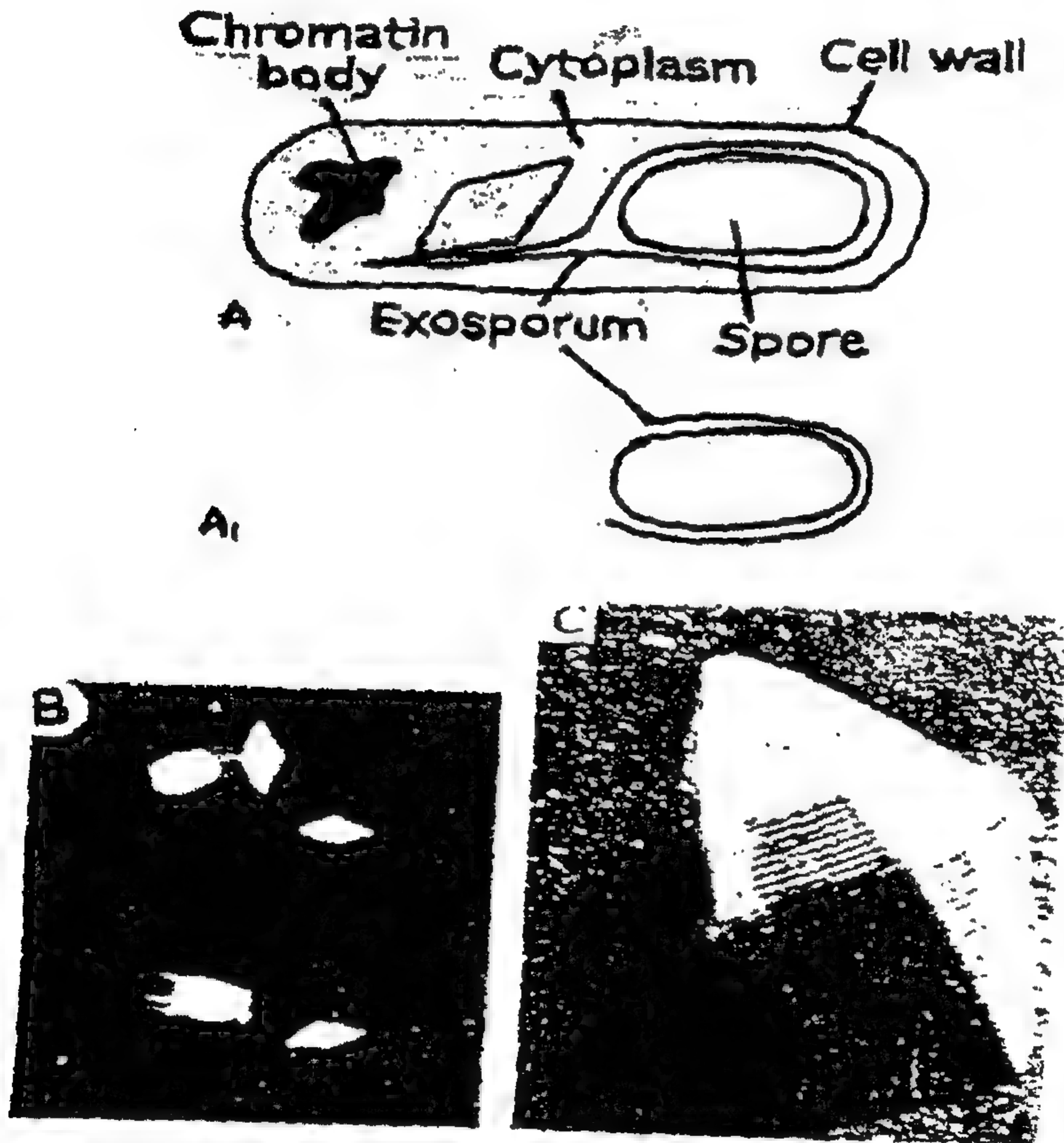
٥- ثبات الباسيلليس تورينجينسيز في البيئات الاستوائية

من مقالة للدكتور O.N. Morris من محطة البحوث الزراعية بمانيتوبا - كندا. لقد قدم الدكتور موريس بالقول بان الفقد السريع للنشاط للمرضات الحشرية بواسطة ضوء الشمس لوحظ على مستوي العالم؟. لقد ثبت ان ضوء الشمس يحدد الفاعلية الباقية والكفاءة في الحقل . هذا العامل يعتبر محدد اذا كانت الحشرة المستهدفة تقضي وقتا طويلا من تغذيتها في اماكن محمية او اذا كان الممرض ينتقل للأجيال التالية عن طريق الاوراق الملوثة كما في فيروس البولى هيدروزييس السيتوبلازمي. الموجات الضوئية القاتلة للجراثيم من الشمس والتي تصل الى سطح الارض تتراوح من ٢٩٠ وحتى ٣٩٠ نانوميتر وتكون حوالي ٧% من الضوء الكلى للشمس على مستوي الارض. من المعروف ان الجراثيم البكتيرية تمتص كلا الاشعة فوق البنفسجية (٣٣٠ نانوميتر) والضوء المرئي (قريبا من ٤٠٠ نانوميتر). البلورات الذائبة للباسيلليس تورينجينسيز (Bt) تمتص ٢٧٣ نانوميتر ولكن القليل من هذه الموجات (=٢%) تصل سطح الارض. بالرغم من ان نسبة الاشعاع الشمسي القاتلة للميكروبات والساقطة على الارض صغيرة الا انها قد تبدو فعالة في هدم وتدهور B.t. في الطبيعة ومن ثم تحدد فاعليتها في مكافحة الحشرات. هذا يحدث في البيئات الاستوائية على وجه الخصوص حيث الظروف البيئية السائدة سوف تكون في متناول الكائنات الدقيقة. لقد لوحظ ان الحرارة والرطوبة النسبية وسطح الورقة واخراجاته تسبب هدم وفقد في النشاط الميكروبي سواء كل على حدة او مع اشعة الشمس مشاركة.

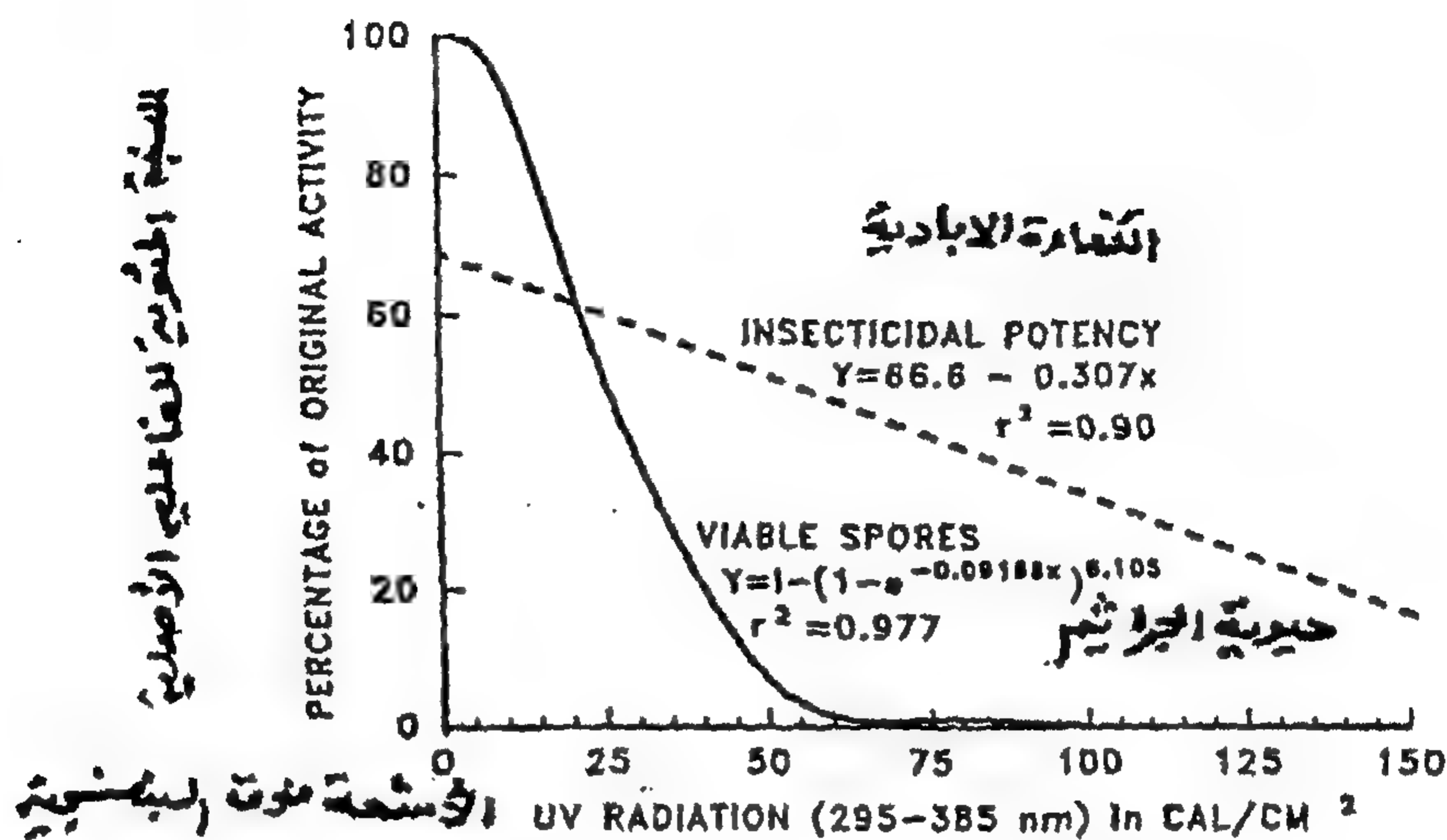
في هذا المقام سوف نقوم باستعراض بعض النظريات عن كيفية احداث الفعل في الهدم بالضوء للباسيلليس تورينجينسيز وثبات البكتريا في البيئات المعتدلة والاستوائية وطرق اطالة النشاط الباقي الفعال لبكتريا Bt في الزراعات والغابات. الشكل (٤-١) يوضح جراثيم وبلورات الاندوتوكسين والفحص الالكتروني للدلتا - اندوتوكسين التي تم تصويرها بال electron micrographs الشكل (٤-٢) يوضح الخفض في كلا حيوية الجراثيم والكفاءة الابادية ضد الحشرات مع زيادة فترة التعرض للاشعة فوق البنفسجية حيث حدث خفض معنوي كبير في حيوية الجراثيم بدرجة اسرع مما حدث في نقص الكفاءة الابادية على الحشرة (Morris ١٩٨٣). لقد فقدت الجراثيم ٥٠% من فعاليتها بعد ٢٦ كالوري/سم^٢ من ضوء الشمس بالمقارنة ٦٠ كالوري/سم^٢ لبلورات الاندوتوكسين. لقد ادت البيانات الى الاقتراح بانه اذا كانت الجراثيم تساهم في الفعل الابادي فانها تحقق

ذلك فقط خلال فترات التعريض الاولى لاشعة الشمس. الشكل (٤-٣) يوضح طيف الانعكاس لجراثيم Bt.

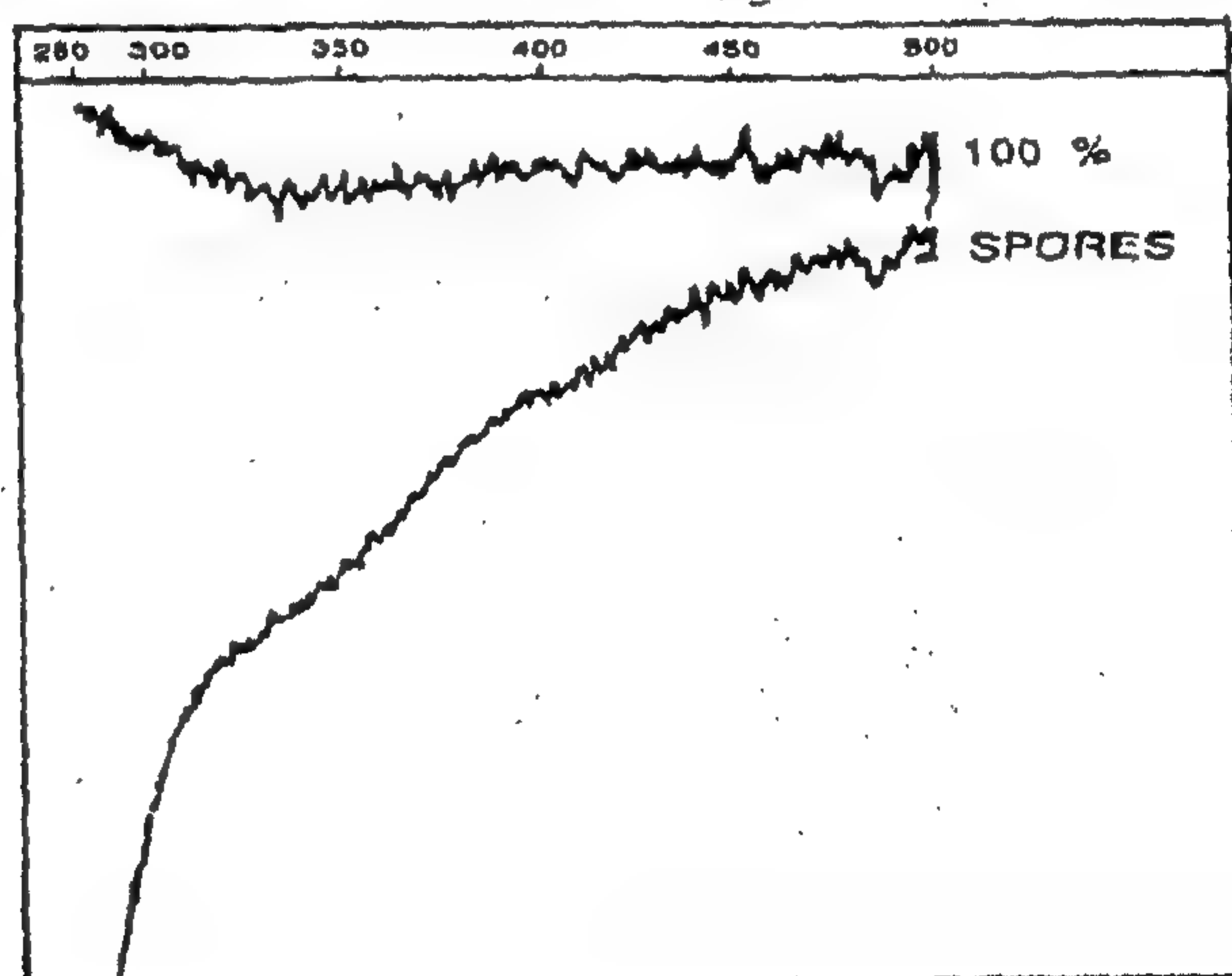
في الضوء متعدد الالوان باستخدام نموذج كاري الاسبكتروفوتوميتر. هذا يحدد انعكاس المعلق النقي لجراثيم Bt على غشاء راسح ميلليبور باستخدام الاضاءة متعددة الالوان والاضاءة وحيدة اللون والتي اظهرت قمة امتصاص بين ٢٨٠-٣٢٠ نانوميتر مع نقص الامتصاص بين ٣٢٠ وحتى ٥٠٠ نانوميتر. عدم تماثل المنحنى عند اعلى من ٣٢٠ نانوميتر قد يرجع الى التوزيع غير المتجانس للجراثيم على ورق الترشيح.



شكل (٤-١): رسم توضيحي لخلية الباسيليس ثورينجينيسيز يوضح الجراثيم وبلورات جسيمات الاندوتوكسين.

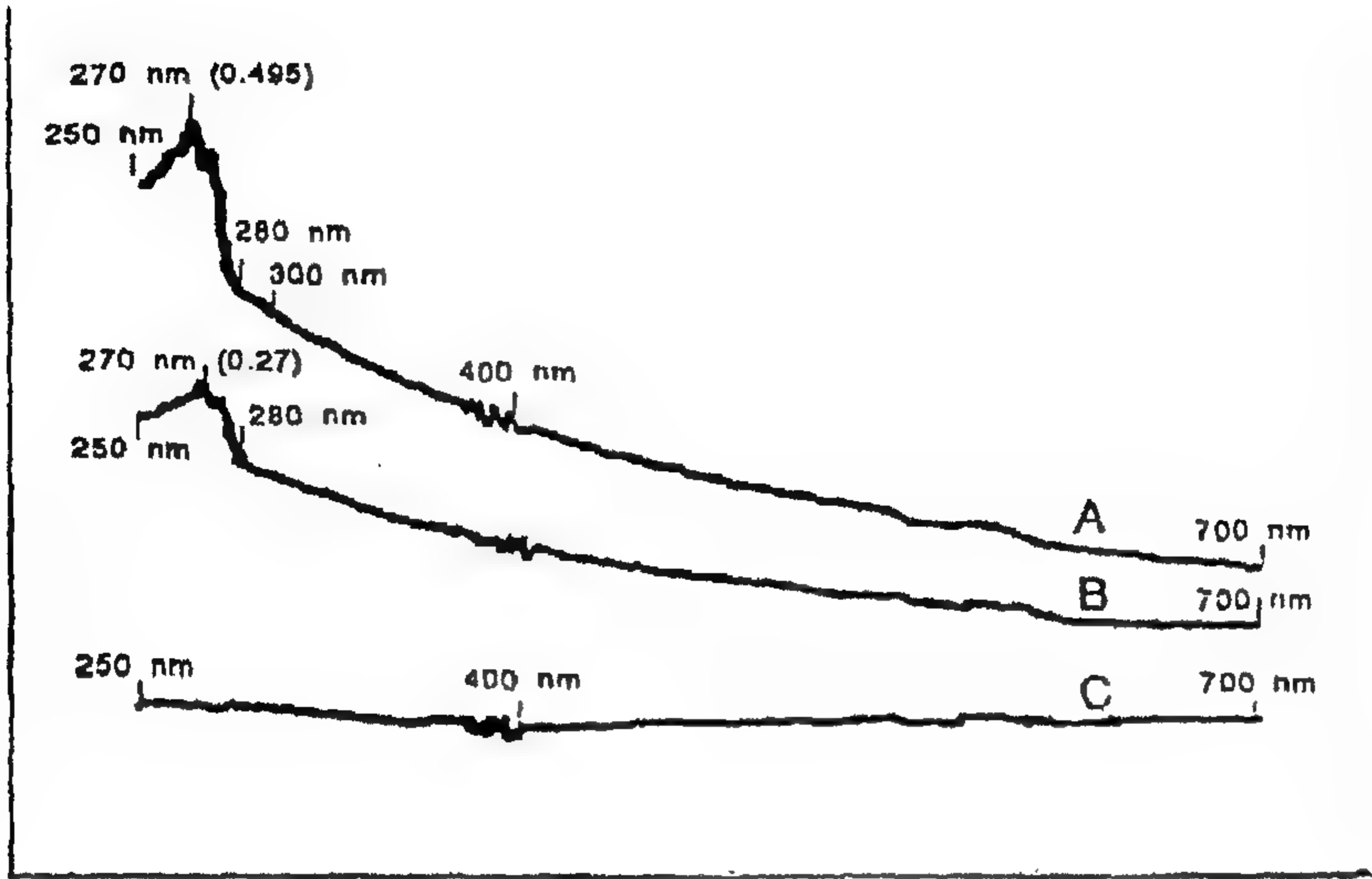


شكل (٤-٢): منحنيات التدهور في سمية الجراثيم/بلورات الباسيليليس ثوريينجيسيز من الصنف ثورستاكي بعد التعرض لأشعة الشمس في أوتاوا- كندا.



شكل (٤-٣): انعكاس طيف جراثيم الباسيليليس ثوريينجيسيز في الضوء متعدد الألوان

الشكل (٤-٤): يوضح قمم الامتصاص الطيفي للجراثيم النقية في المطلق. يوجد امتصاص معنوي بين ٢٥٠ نانوميتر و ٤٠٠ نانوميتر بقمة عند ٢٧٠ نانوميتر لقد تم القياس على سبكتروفوتومتر بيكمان اكناسي ٣ باستخدام مدي الكشف ٢٥٠-٧٠٠ نانوميتر.



شكل (٤-٤): قمم الامتصاص الطيفي للجراثيم الباسيليليس تورينجسيز
 لقد تكونت قناعة لدي كاتب المقال ان الاطوال الموجبة القائلة للجراثيم في بكتريا
 Bt تكون في النهاية الدنيا بالقرب من الاشعة فوق البنفسجية والتي تتراوح من ٢٨٠
 وحتى ٣٤٠ نانوميتر. هذا ولو ان الباحثان Griego and spence قدما دليل على ان هم
 Bt بواسطة اشعة الشمس ترجع في جزء منها الى الأطوال الموجية القريبة من ٤٠٠
 نانوميتر والتي تقوم الجراثيم بامتصاصها بسهولة.

كيفية احداث فعل الاشعة فوق البنفسجية على بكتريا الباسيليليس Bt.
 هناك اتفاق عام مفاده ان اشعة الشمس تهدم وتفقد جراثيم وبلاورات بكتريا Bt
 فعاليتها ومن هنا يتبادر الى الازهان سؤال يقول ويسال عن التقنية او الميكانيكية التي
 تحدث من خلالها هذا التأثير. هناك نظريات عديدة ولكن لا يوجد اتفاق عام. في البداية
 قيل انه اذا كانت الاطوال الموجية الابادية للجراثيم تقع بين ٢٨٠ وحتى ٣٨٠ نانوميتر
 فان هذا يعضد حقيقة ان الاحماض النووية والبروتينات معروف عنها انها تفقد طبيعتها
 عند التعرض للاشعة فوق البنفسجية اقل من ٣٤٠ نانوميتر (Jagger ١٩٦٧). اذا امكن
 تحديد الميكانيكية الواقعية التي تؤدي الى فقد سمية البروتين وخروجه عن طبيعته فانه
 يمكن وضع اساس عقلائي لهندسة التوكسين. لقد اعتبر دكتور H.Kaplan بالمركز

القومي للبحوث في أوتاوا-كندا بأنه من غير الطبيعي أن يتأثر البروتين بواسطة ضوء الشمس. لقد اكتشف الباحث وجود شوائب في بلورات البروتين وعندما يصل الضوء إليها فإن هذه الشوائب تنشط الطاقة في الأوكسجين أو تنشط الأكسجين بالطاقة وفي الناحية التي تهاجم البروتين وتجعله غير فعال. لقد أشار د. كابلان أنه في خلال ٨ ساعات فإن التوكسين الأولي لبكتريا B.t. تفقد نصف سميته وفي جزء من هذا التأثير فإن الأشعاع بضوء الشمس لبلورات الباسيليس يعيدها غير ذائبة مرة أخرى.

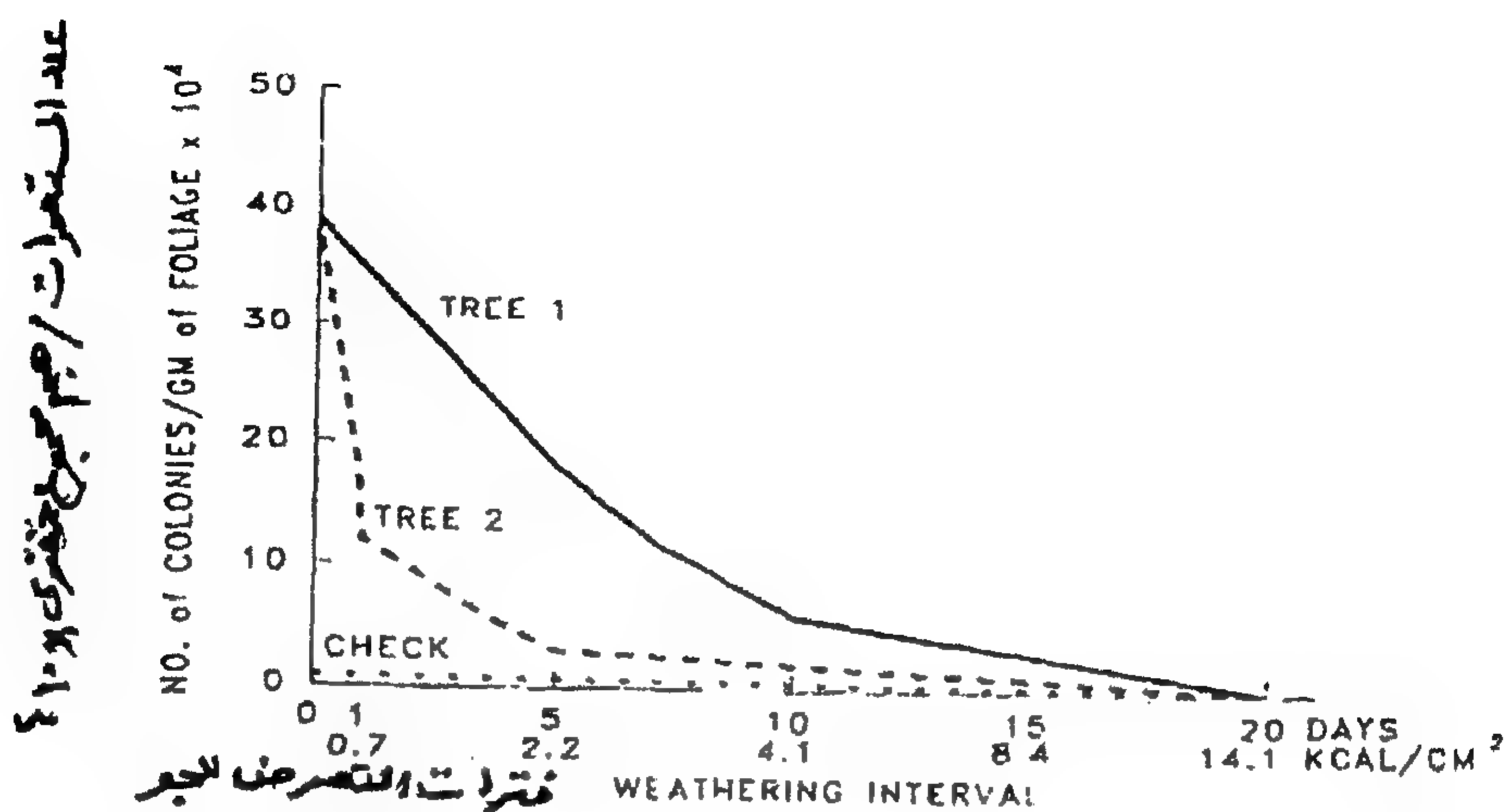
لقد أعطي Poz.sgay وآخرون (١٩٨٧) أدلة جيدة تفيد بأن الحمض الأميني تريبتوفان يتحطم في البلورات المعرضة لأشعة الشمس ومن ثم يفقد المستحضر فعاليته. لقد أشار الباحثان كابوشينسكي وميتشيل (١٩٨١) أن أشعة الشمس تحطم نظام الكتاليز في البكتريا إيشيريشياكولاي. يمكن إصلاح هذا الضرر أو تفادية عن طريق إضافة الكتاليز أو البيروفات إلى البيئة أو المزرعة. لقد أظهرت أحدث دراسة أجراها كابلان ومعاونوه أن طيف الأشعة الشمسية بطول ٣٠٠-٣٥٠ نانومتر تكون مسنولة بشكل كبير عن تحطيم البلورات المعرضة لسائل التخمر وتجعل البلورات حساسة للضوء. هذه فكرة في غاية الأهمية لأنها أدت إلى الاقتراح بضرورة المناورة بوسط المزرعة للحفاظ على البكتريا Bt أقل حساسية لضوء الشمس. في الحقيقة فإن الباحث ساندروز في كندا اقترح في عام ١٩٧٤ أن جراثيم B.t. التي تتغذى جيداً تكون أكثر مقاومة للأشعاع عما هو الحال مع غير المغذاة جيداً.

ثبات بكتريا B.t. في البيئة persistence: الثبات القليل لبكتريا B.t. على الزراعات بعد التعرض لأشعة الشمس المباشرة تأكد مرات عديدة. الفاعلية ذات الأثر الباقي على المحاصيل يبدو أنها ترتبط بأكثر من مجرد التعرض للأشعة فوق البنفسجية. لقد أشار موريس ومور (١٩٧٥) كمثال أن بكتريا Bt التي استخدمت على أشجار البسيسية فقدت ٥٠% من الفعل الإبادي في ٨ أيام في الظل بالمقارنة بفقد ٥٠% خلال يومان فقط مع التعرض لضوء الشمس. الفاعلية ذات الأثر الباقي موضحة في جدول (٤-١٦) والشكل (٤-٥). البيانات الموجودة في الشكل توضح حدوث خفض معنوي في حيوية الجراثيم (Morris ١٩٧٧) بعد يوم واحد من التعريض للظروف المناخية في كندا. أظهرت بيانات اختبارات التقسيم الحيوي على نفس الأشجار مستوى عالي من الفعل البيولوجي مع استمرار الفاعلية حتى ٢٠ يوم بسبب البلورات. تحت الظروف تحت الاستوائية في الولايات المتحدة الأمريكية تراوح الفعل الإبادي لبكتريا Bt على نباتات القطن ما بين ٣٠ حتى ٤٨ ساعة (Beegle وآخرون ١٩٨١).

جدول (٤-١٦) : نصف فترة الحياة المقدرة لبعض الممرضات الحشرية مع ضوء الشمس الطبيعي في شمال امريكا.

| الممرض Pathogen | Half-life (Hrs) نصف فترة الحياة (ساعة) |
|------------------------|--|
| Nosema trichoplusiae | 8 |
| Heliothis NPV | 24 |
| Trichoplusia NPV | 48 |
| Pieris GV | 42 |
| Bacillus thuringiensis | |
| Spores | 24 |
| Crystals | 72 |
| Metarrhizum anisopliae | 8 |
| Nomuraea rileyi | 60 |
| Nosema necatrix | 1 |

لقد تراوحت نصف فترة الحياة تحت الظروف المصرية على نباتات الخروع ما بين ١٩ حتي ٤٠ ساعة (Ragaei ١٩٩٥). لقد اشار حامد وحسانين (١٩٨٦) في مصر انه بعد ٦ أيام من التعرض لضوء الشمس احدثت اوراق القطن المعاملة ببكتريا Bt قتل ٧ % في يرقات دودة ورق القطن بالمقارنة بنسبة ٢٧% على اوراق القطن الموضوعة في الظل.



شكل (٤-٥) : منحنيات انهيار الجراثيم في بكتريا Bt من الصنف كورستاكي عندما استخدمت بالرش الجوي لأشجار البيسية في أونتاريو-كندا

اطالة الفعل الباقي للباسيليس تورينجينسيس: لقد أجريت محاولات عديدة في السنوات الأخيرة لاطالة فترة حياة بكتريا B.t. المعرضة للأشعة فوق البنفسجية من ضوء الشمس. في عام ١٩٨٣ أوصى Morris أن أي مواد امتصاص لهذه الأشعة UV absorbers مع Bt يجب أن يكون لها قدرات امتصاص عالية في مدى الأطوال الموجية ٣٣٠-٤٠٠ نانوميتر. الجدول (٤-١٧) يلخص هذه المحاولات لقد قام موريس (١٩٨٣) باستخدام الصبغات التي تذوب في الماء مثل DS-49

(Sodium 2,2-dihydroxy-4,4-dimethoxy-5-sulfobenzophenone sodium salt of formyl-m-benzene) Erio Acid x Bloo disulphonic acid

و الصبغة (disulphonic acid). هذا المخلوط مع قمم أطوال موجية ٨٤، ٣٣٠، ٥٠٤ نانوميتر زادت من النشاط الباقي الفعال لبكتريا Bt على أشجار البيسية البيضاء بمقدار ٢,٩ مرة. لقد زاد محلول ٢% من الكونغو رد النشاط الفعال على نباتات الخروع بمقدار ٣,٣ مرة في مصر (راجي، ١٩٩٠) لقد أشار دنكلوشاشا (١٩٨٩) أن بكتريا Bt المكبسلة مع النشا مع ١% تونجو رد احتفظت بحوالي ٥٠% على الأقل من نشاطها الأصلي بعد ١٢ يوما من التعرض لضوء الشمس (٥٠% من الفاعلية الأصلية دون التعرض لضوء الشمس تساوي ٢ يوم). حامض الفوليك وحامض البار-أمينو بنزويك كمصفاة لضوء

الشمس كانت أقل فاعلية. لقد اشار كوهين وآخرون (١٩٩٠) ان حماية بكتريا Bt من الضوء عن طريق امتصاص الكروموسفورات الكانيونية مثل اكريفلافين و الروداين B. بعد ١٢ ساعة من التعرض للاشعة فوق البنفسجية وصلت نسبة الموت حوالي ٧٨% مع الاكريفلافين بالمقارنة بموت ٥% بدون الاكريفلافين. هذا الاقتراب يتضمن امتصاص جوهري كبير بين المبيد العضوي والمادة الحساسة للضوء المختارة chromophore. هذا الترتيب الفراغي يسهل نقل الطاقة او الالكترونات بين الجزيء المثار والكروموسفور. في هذا السبيل فان التفاعلات الضوء كيميائية تمنع جزئيا او كليا.

جدول (٤-١٧) : طرق إطالة النشاط الباقي الفعال لبكتريا Bt المعرضة للاشعة فوق البنفسجية.

| المرجع Reference | conuntry البلد | Substate الوسيط | الطريقة Technique |
|-------------------------|-------------------|--------------------|------------------------------------|
| Morris, 1983 | Canada | Balsam Fir | 1% DS49+1% EAR |
| Ragaei, 1990 | Egypt | Castor | 2% Congo Red |
| Dunkjle, & shasha, 1989 | USA | Starch granules | Starch-encapsulated + 1% Congo Red |
| Cohen et al., | Israel | Artificial diet | Acriflavin |
| 1990 Mycogen, 1986 | USA | ? | M-CAP (Mycogen) |

طريقة الكبسولات M-CAP (Mycogen) تتضمن كبسلة الدلتا-اندوتوكسين داخل خلايا مينة وثابتة للسيدوموناس فلوريدينس و هي بكتريا تكون مستعمرات في جذور الذرة. يعتقد كاتب المقال ان هذه الطريقة المهندسة وراثيا لزيادة الفاعلية الباقية تحت الاحتكاك في الولايات المتحدة الامريكية في الوقت الراهن وان المستحضر في طريقة للعرض في الاسواق. البيانات الموجودة في الجدول (٤-١٨) توضح ان المواد congo Red, Orzan والمولاس تستطيع حماية Bt من الهدم السريع وفقد الفاعلية من جراء التعرض لضوء الشمس بعد المعاملة على نباتات الخروج. يوضح جدول (٤-١٩) ان الكونجورد لم يكن فعالا في حماية Bt على نباتات الكانولا بناء على نسب موت حشرة الدودة القارضة. هذا بالرغم من ان تصفية ضوء الشمس ذات فاعلية واضحة في خفض نشاط التغذية ليرقات الدودة.

جدول (١٨-٤) : الفاعلية النسبية لبعض المواد الماصة لاشعة UV لبكتريا Bt تحت الظروف البيئية المصرية.

| Relative Efficiency الفاعلية النسبية | | |
|--------------------------------------|---|--|
| UV Absorber المواد الماصة للاشعة | Artificial UV source المصدر الصناعي للاشعة | Sunlight castor plants ضوء الشمس على الخروع |
| B.t alone exposed | 1.0 | 1.0 |
| B.t. + 10% Orzan | 2.2 | 5.6 |
| B.t. +25% Molasses | 2.4 | 3.7 |
| B.t. + 2% Congo | 2.1 | 3.3 |

جدول (١٩-٤) : الموت ونشاط التغذية لحشرة M.Coofigurata على نباتات الكانولا المعاملة ببكتريا Bt مع التعريض لمصفاة امتصاص الاشعة.

| Treatment المعاملة | Mortality (%) الموت % | Mean Wt. Gain of Surviviors (MG \pm SD.) الوزن المكتسب |
|---------------------------------|--------------------------|--|
| B.t. without Congo Red-Shade | 93 | 32 \pm 19 |
| B.t. without Congo Red-sun | 22 | 22 \pm 15 |
| B.t. with Congo Red-sun | 22 | 0 \pm 0 |

في النهاية اقترح الباحث انه في البيئات الاستوائية فان الطريقة البسيطة نسبيا التي تتمثل في اضافة صبغة الكونجورد المذابة في الماء مع ٢٥% مولايس تعتبر وسيلة فعالة وعملية في طريقة اطالة فاعلية بكتريا Bt المستخدمة على المحاصيل . من المحتمل الا ننصح باستخدام هذه الصبغة على نطاق واسع في هذا الوقت حيث لم تتحقق القبول البيئي الكامل لهذا الاقتراح بعد.

REFERENCES

- Beegle, C.C. ; Dulmlage, H.T. ; Wolfersberger, H.D. and Martinez, E. (1981).
 Persistance of *Bacillus thuringiensis* Berliner insecticidal activity on cotton foliage. *Env. Entomol.* 10, 400-401.
- Cohen, E. ; Rozen, H. ; Joseph, T. ; Braun, S and Marguiles, L.(1990).
 Photoprotection of *Bacillus thuringiensis* kurstaki from ultraviolet radiation. *J. Inverteber. Pathol.* 57, 343-351.
- Dunkle, R.L. and shasha, B.S. (1989). Response of starch-encapsulated *Bacillus thuringiensis* containing ultraviolet screens to sunlight. *Environ. Entomol.* 18, 1036-1041.
- Griego, V.M. and spence. K.D. (1978). Inactivation of *Bacillus thuringiensis* spores by ultraviolet and visible light. *Appl. Environ. Microbiol.* 35, 906-910.
- Jagger, J. (1967). Introduction to research in ultraviolet photobiology. Prentice Hall, N.J. 146 pp.
- Hamed, A.R. and Hassanein. F.A. (1986). Persistance and virulence of *Bacillus thuringiensis* under sunny shady conditions. *Bull. Ent. Soc. Egypt. Econ. Series*, 14-73-77.
- Kapuscinski, R.B. and Mitchell, R. (1981). Solar radiation induces sublethal injury in *Escherichia coli* in sea water. *Appl. Environ. Microbiol.* 43, 670-674.
- Morris, O.N. (1977). Long term study of the effectiveness of aerial application of *Bacillus thuringiensis*- acephate combinations against the spruce budworm *choristoneura fumiferana* (Lepidoptera, Tortricide). *Can. Ent.* 109, 1239-1248.
- Morris, O.N. (1983) Protection of *Bacillus thuringiensis* from inactivation by sunlight. *Can . Ent.* 115, 1215-1227.

- Morris, O.N. and moore, A. (1975). Studies on the protection of insect pathogens from sunlight inactivation.II. Preliminary field trials. Rep. Chem. Control Res. Inst. CC-X-113. 34, PP.8.
- Pozsgay, M.; Fast,P. ; Kaplan , H.and carey, P.R. (1987). The effect of sunlight on the protein crystals from *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1 and NDR 12 : a Raman spectroscopic study . J. Invertebr. Pathol. 50, 246-253.
- Puztai, M. ; Fast. M. ; Eringorten, L. ; Kaplan H. ; lessard, T and carey .P.R. (1991). The mechanism of sunlight – mediated inactivation of *Bacillus thuringiensis* crystals. Biochem. J. 273, 43-48.
- Ragaei, M.(1990). Studies on the effect of *Bacillus thuringiensis* Berliner on the greasy cutworm *Agrotis ypsilon* (Rott). Ph.D. thesis, Univ. of cairo, 266 pp.

٦- زيادة كفاءة وفاعلية الباسيلليس تورينجيسيز للاستخدامات الحقلية:

اضافه المواد الاضافية adjuvants مع المبيدات الحشرية الميكروبية لتحقيق الكفاءة العالية درس بواسطة العديد من البحوث بهدف زيادة مجالات الاستخدام و الفاعلية او للتغلب على مشكلة الثبات القليل لهذه المبيدات الحشرية في الحقل. لقد قام أ.د. سلامة ومعاونوه بتطوير وسائل بيوكيميائية بسيطة لزيادة كفاءة بكتريا باسيلليس تورينجيسيز B.t. ضد دودة ورق القطن والدودة القارضة . هذه المقالة اعدت بواسطة أ.د. حسين سمير سلامة بالمركز القومي للبحوث - مصر.

ثبات Bt في الحقل : Persistence of B.t. in the Field

من المعروف ان بكتريا B.t. لها اثر باقي فعال قصير جدا. الممرض غير متحرك ولا يستطيع الهروب من الظروف المعاكسة . في حقول القطن المصرية وجد ان ثبات جراثيم B.t. اظهر نقصا واضحا بعد يوم واحد فقط من التعرض للظروف الجوية كما ان نقص الحيوية تزايدت بشكل مضطرب مع اطالة فترة التعرض في الحقل. لقد ثبت ان نصف فترة حياة الجراثيم لمستحضرات سلالات بكتريا B.t. اختلفت ما بين ٧٥ وحتى ٢٥٦ ساعة كما لم تظهر ارتباط مع درجة الحرارة الموجودة على سطوح اوراق القطن المعرضة للشمس. يبدو ان الاشعة فوق البنفسجية هي العامل المحدد السائد الذي يؤثر على حيوية الجراثيم (سلامة وآخرون ١٩٨٣) من الطبيعي اننا اذا نجحنا في اطالة ثبات B.t. في الحقل يمكن تحقيق الكفاءة والفاعلية المطلوبة في هذه الوسيلة الحيوية. في هذا المقام اشار د. سلامة الى اجراء العديد من الدراسات في معامل المركز القومي للبحوث بهدف عزل طفرات من البكتريا قادرة على مقاومة العوامل الطبيعية خاصة الاشعة فوق البنفسجية والحرارة. لقد امكن الحصول على طفرات عديدة وتم تقييم كفاءتها ضد الحشرات المستهدفة. مازال هناك كثير من العمل يضطلع به فريق من الباحثين في مجالات الهندسة الوراثية والتكنولوجيا الحيوية. السبب الذي من اجله تم وضع المسؤولية على عاتق الزملاء في مجال الهندسة الوراثية ان التوكسين الذي تنتجه بكتريا B.t. يحدد بواسطة جين منفرد مما يجعل من السهولة نقل مهمة انتاج التوكسين لكائنات حية اخرى.

لقد اتخذت خطوات جادة لتطوير سلالات B.t. مع مدي واسع في العوائل المحددة والمقبولة تجاريا. تطوير اسلوب الارتباط Conjugation لنقل البلازميدات المشطرة للتوكسين بين عزلات B.t. قد تؤدي الى انتاج سلالات ذات مدي فاعلية واسع. حديثا جدا تم انتاج النباتات المهندسة وراثيا في الولايات المتحدة الامريكية والتي تعبر عن جين

توكسين بكتريا B.t. هذا التطور والانجاز يستلزم اتخاذ الحيطه والحذر حيث انه بالرغم من كونه يحمل افاق مذهلة في مستقبل استراتيجيات وقاية النباتات كما يقدم فرصا تجارية عظيمة لاستخدام منتجات مكافحة الافات التي تعتمد على الممرضات الميكروبية الا ان الامان مازال محل لتساؤلات كثيرة سواء على البيئة و الانسان ومجتمع الحشرات. بالتوازي مع بحوث الهندسة الوراثية تجري محاولات ايجاد اقترابات اخري للتغلب على مشكلة نقص ثبات بكتريا B.t. في الحقول الزراعية.

تقوية فعل بكتريا B.t. من خلال منشطات التغذية والطعوم والمواد الاضافية:
في الاقتراب الاول توجهت البحوث نحو ايجاد المواد المثيرة لبعض الحشرات المستهدف مكافحتها وتقييم الدور الذي تلعبه في زيادة كفاءة B.t. مع توقع ان هذه المواد سوف تجعل البكتريا اكثر قبولا مما يؤدي الى زيادة التناول. لقد اتضح ان مستخلصات بعض النباتات العائلة ومكوناتها المتطايرة وغير المتطايرة اظهرت فاعلية ونشاط في تقوية potentiating تاثيرات B.t. عندما خلطت بها (سلامة واخرون ١٩٨٥-١). (جدول ٤-٢٠ ، ٢١-٢٢). كذلك فان المواد الاضافية coax و المولاس ودقيق فول الصويا و السكر و ومخاليطها مع مسحوق ورق القطن او مستخلصاتها يمكن ان تستخدم لزيادة كفاءة B.t. (حافظ واخرون ١٩٨٧) (جدول ٤-٢٢).

جدول (٢١-٤) : تأثير التركيزات المختلفة من مستخلص اثيرالبترول لاوراق القطن على كفاءة بكتريا B.t. الصنف entomocidus ضد دودة ورق القطن.

| %conc. Of extract in the diet with B.t. | slope | variance | LC ₅₀ ug/ml | Potency IU/mg |
|---|-------|----------|------------------------|---------------|
| 1 | 0.97 | 0.0809 | 17.3 | 241034 |
| 0.1 | 1.64 | 0.0091 | 51.1 | 81602 |
| 0.01 | 0.64 | 0.0358 | 91.7 | 45473 |
| 0.001 | 1.06 | 0.0036 | 126.2 | 33042 |
| المقارنة | 0.92 | 0.0190 | 113.0 | 36902 |

بناء على هذه النتائج اجري النقراشي ومعاونوه (١٩٨٤) بعض الدراسات بهدف تطوير طعوم لمكافحة دودة ورق القطن ببكتريا الباسيلليس B.t. عند اضافة هذه المستحضرات للممرض كان متوقع ان يجعلها اكثر قبولا للافة المستهدفة ومن ثم تؤدي الى زيادة التناول. لقد تم اختبار مستحضرات مختلفة تحتوي على نسب مختلفة من المكونات المتحصل عليها من بذور القطن وفول الصويا للوقوف على فعاليتها مع بكتريا B.t. ضد الحشرة المستهدفة كما استخدم الكواكس كمادة مرجعية للمقارنة. لقد ادت المستحضرات المحتوية على اغلفة بذور القطن التي تم استخلاصها بالاسيتون ثم مخلوط الاسيتون - هكسان - مباء الى تحقيق قبول افضل للتناول بواسطة الحشرة بالمقارنة بالمادة الاضافية المعروفة كواكس. لقد وجد ان زيادة محتوى البذور في الجوسيبول يقلل من كفاءة المستحضرات كما لوحظ مع المستحضرات التي تحتوي على قشور بذور القطن التي تم استخلاصها بالهكسان فقط. التغيرات في الكمية الكلية من زيت بذرة القطن في المستحضر لم يكن له تأثير على الفاعلية بينما ادت اضافة المستخلص الطازج لقشور بذور القطن بالاسيتون الى زيادة الفاعلية. المستحضرات التي تحتوي على دقيق فول الصويا كانت عالية الفاعلية.

لقد اجريت بعض الاختبارات الحقلية بواسطة سلامة ومعاونوه (١٩٨٥-٢) لتقدير نشاط مستحضرات بكتريا Bt عندما استخدمت على نباتات القطن (جوسيبوم باربادنيس الصنف جيزة -٦٩) ضد دودة ورق القطن. بناء على النتائج التي تحصل عليها عن دور منشطات التغذية على يرقات دودة ورق القطن تم اجراء تقييم موسع لمعرفة دورها في زيادة فعالية مستحضرات Bt من خلال زيادة تناول الممرض. في هذه التجارب تم اختبار مفاضلة بين الاصناف Dipel, kurstaki, subtoxics, galleriae, entomocidus بتركيزات مختلفة سواء منفردة او مخلوطة مع بعض المنشطات الغذائية بالمقارنة

بالكواكس. اظهرت النتائج المتحصل عليها ان اوراق القطن زادت من فاعلية الممرض. لم يثبت اي من منشطات الغذاء التي اختبرت اي تأثير في اطالة نصف فترة حياة جراثيم المستحضر البكتيري Bt الذي اظهر تفاوت كبير مع اقصى ثبات مقداره ١١٦ ساعة. اظهر التقييم الحيوي لزيوت فول الصويا وبذرة القطن والذرة (كعوائل طبيعية لدودة اللوز الامريكية) افضلية لزيوت فول الصويا عن الانواع الاخرى في تحسين كفاءة Bt ضد الحشرة. دقيق اللوبيا وفول الصويا ودقيق الذرة وبذرة القطن وجدت فعالة كذلك يليها القمح والارز والشعير.

جدول (٢٢-٤) : تأثير منشطات التغذية المختلفة على كفاءة Bt من الصنف entomocidus ضد دودة ورق القطن (Boisduvalle ١٨٨٣) من رتبة حرشفية الاجنحة.

| المواد الاضافية مع الغذاء مع البكتريا Additives incorporated into the diet with B.t. | الاتحادار | التباين | التركيز النصفى LC ₅₀ ug/ml | الكفاءة Potency IU/mg |
|---|-----------|---------|--|--------------------------|
| Untreated (without additives) | 1.23 | 0.015 | 200.3 | 30734 |
| 2% coax | 0.94 | 0.005 | 152.3 | 40420 |
| % coax | 0.95 | 0.005 | 98.1 | 62752 |
| 0% coax | 1.01 | 0.003 | 75.4 | 81645 |
| ucrose 2% | 2.01 | 0.078 | 110.0 | 51055 |
| Cottonseed flour 3%+sucrose 1% | 1.35 | 0.041 | 176.6 | 31801 |
| Cottonseed flour 3%+sucrose 2% | 2.01 | 0.220 | 182.6 | 30756 |
| Cottonseed flour 5%+sucrose 1% | 1.13 | 0.002 | 158.4 | 35455 |
| Cottonseed flour 5%+sucrose 2% | 1.02 | 0.005 | 112.1 | 50098 |
| Untreated (without additives) | 1.46 | 0.006 | 185.7 | 62032 |
| 1% molasses | 1.105 | 0.012 | 170.1 | 67709 |
| 2% molasses | 1.55 | 0.005 | 162.5 | 70884 |
| 5% molasses | 1.16 | 0.021 | 105.1 | 109568 |
| Untreated (without additives) | 2.3 | 0.002 | 121.9 | 91565 |
| Cotton leaves powder 5% | 1.4 | 0.021 | 123.2 | 90592 |
| Cotton leaves powder 5% + sucrose 2% | 1.5 | 0.001 | 93.4 | 119467 |
| Petroleum ether extract of cotton leaves (0.1%) | 0.7 | 0.021 | 88.3 | 126336 |
| Petroleum ether extract of cotton leaves 0.1%+2% sucrose | 2.1 | 0.027 | 64.9 | 171958 |
| Water extract of cotton leaves 5% | 2.1 | 0.002 | 121.6 | 91791 |
| Water extract of cotton leaves 5%+ sucrose 2% | 0.9 | 0.003 | 89.1 | 125231 |
| 5% soybean flour | 0.7 | 0.018 | 86.9 | 128489 |

تغذية الباسيلليس B.t. عن طريق المواد الاضافية الكيميائية:

في الاقتراب الثاني تم تطوير بعض الوسائل البيوكيميائية للتغلب على مشكلة الثبات القليل لبكتريا الباسيلليس B.t. وفي نفس الوقت لزيادة مجالات فعالية ونشاط الدلتا - اندوتوكسين للـ B.t. من السلالة كورستاكي HD-1. حتى اواخر الستينيات كان الانتاج الصناعي لبكتريا Bt يعتمد على الطرز السيرولوجي-١ وهو باسيلليس Bt تورينجينسيز كمركب قياسي. لقد اشار Dulmag (١٩٧٣) الى اكتشاف سلالة HD-1 سلالة Bt كورستاكي وهي اكثر كفاءة بمقدار ١٦ مرة (x) عن السلالات السابقة التي استخدمت في الانتاج التجاري. لقد حددت هذه السلالة في امريكا على انها سلالة مرجعية قياسية لتقييم المستحضرات المحتوية على السموم الداخلية او الاندوتوكسينات للبكتريا Bt. بالرغم من النجاح الذي تحقّق في مكافحة عدد من حشرات حرشفية الاجنحة باستخدام هذا المستحضر كانت الانواع الاخرى اقل حساسية من حرشفية الاجنحة.

لقد تم اختبار مجاميع مختارة من المركبات الكيميائية في هذا السبيل بناء على عدة معايير منها ان المركب يجب الا يكون سام للانسان والحيوان كما لا يكون له اية تاثيرات ضارة على النباتات كما يكون قابل للانحيار الحيوي وكذلك يكون متاح وشائع وباسعار قليلة. الكيميائية التي اختبرت شملت الاملاح غير العضوية والاحماض الامينية والمواد المستحلبة للدهون والمواد القريبة للبروتين والاحماض العطرية. اظهرت النتائج المدونة في جداول (٤-٢٣، ٤-٢٤) ان املاح الكالسيوم مثل كربونات الكالسيوم واكسيد الكالسيوم تزيد بشكل ملحوظ كفاءة Bt ضد دودة القطن والدودة القارضة. هذا قد يرجع الى حقيقة ان اضافته هذه الاملاح سوف تغير من حموضة المعدة حيث تصبح اكثر قلوية ومن ثم تزيد من تكسير الاندوتوكسين وتحرر الاجزاء السامة. اظهر كبريتات الزنك كذلك تاثير ملحوظ في زيادة كفاءة بكتريا Bt. كيفية احداث الفعل لهذا الملح قد يكون مرتبطا بتاثيره على الانزيمات المحللة الموجودة في معدة الحشرة. الكاتيونات ثنائية الروابط معروف عنها بوجه عام انها تعمل كمنشطات او عوامل مساعدة للعديد من الانزيمات المحللة للبروتينات.

مع الاحماض الامينية (جداول ٤-٢٥، ٤-٢٦) استياميد، ال-فالين، ال-ارجينين والتريبتوفان تزيد من كفاءة B.t. ضد الحشرات المستهدفة من بين المواد المذيبة للبروتين ادت مادة داي صوديوم بيتاجليسر وفوسفات، صوديوم يثوجلوكولات الى زيادة كفاءة بكتريا Bt من ٢-٣ مرات ضد دودة ورق القطن. كيفية احداث الفعل لهذه المجموعة قد ترتبط بتاثيرها في خفض رابطة ثنائي الكبريتيد disulphide في جزيئات البروتين

لبكتريا Bt مما يزيد من ذوبانية الاندوتوكسين في معدة الحشرة (جدول ٤-٢٧). هذه النتائج البشرة امتدت كي تشمل سلالات اخري من بكتريا Bt.

جدول (٤-٢٣): تأثير الاملاح غير العضوية على كفاءة B.t. من الصنف entomocidus ضد دودة ورق القطن.

| الكفاءة Potency IU/mg | رقم | رقم | التركيز النصفى LC ₅₀ ug/ml | Bt الكيمائيات التي تضاف مع بكتريا |
|-----------------------------|-------|------|--|--------------------------------------|
| 182583 | 0.422 | 0.17 | 333.0 | Control (B.t) |
| 1394445 | 0.004 | 1.20 | 43.6 | Calcium oxide (0.05%) |
| 370280 | 1.016 | 0.01 | 164.2 | Calcium hydroxide (0.01%) |
| 1612732 | 0.010 | 1.14 | 37.7 | Calcium acetate (1%) |
| 1105455 | 0.042 | 1.02 | 55.0 | Calcium carbonate (0.25%) |
| 9500000 | 0.025 | 0.87 | 64.0 | Calcium sulfate (1%) |
| 168889 | 0.018 | 1.30 | 360 | Control (B.t) |
| 4053333 | 0.009 | 1.22 | 15 | Zinc sulfate (0.05%) |
| 467692 | 0.008 | 1.28 | 130 | Zinc sulfate (0.05%) |
| 547748 | 0.039 | 0.91 | 111 | Copper sulfite (0.05%) |
| 425175 | 0.008 | 1.06 | 143 | Copper oxide (0.05%) |
| 221091 | 0.380 | 0.40 | 275 | Sodium sulfite (0.25%) |

على امل سد الفجوة الموجود الان بالنظر الى مدى النشاط والفاعلية وكذلك المدي العوائلي والاختيارية البيولوجية. هذه الاقترابات لابد وان تساهم بشكل معنوي في جدوي المكافحة البيولوجية حيث انها تقلل من تكاليف الانتاج خلال تاثيراتها الشديدة على الكفاءة ضد انواع الحشرات المستهدفة. امكانية الاستخدام في الانتاج التجاري للمبيدات الحشرية البكتيرية خلال ادخال هذا المركب الكيميائي في مرحلة ما بعد الحصاد سوف تكون ذات فائدة كبيرة واكثر اقتصادية.

تأثير المواد الواقية من الضوء على فاعلية بكتريا Bt.
مع الاقتراب الثالث تم تقييم المواد الواقية في الضوء photoprotectants.

جدول (٤-٢٤) : تأثير الاملاح غير العضوية على كفاءة بكتريا B.t. الصنف جاليري

HD-234 ضد الدودة القارضة A.ypsilon

| Chemical additive tested الكيميائيات الاضافية المختبرة | LC ₅₀ ug/ml التركيز النصفي | معدل الوفاء | معدل الوفاء | Potency IU/mg الكفاءة |
|---|--|----------------|----------------|-----------------------------|
| Control (B.t.) | | | | |
| (endotoxin only) | 138.16 | 1.81 | 0.0047 | 661494 |
| Calcium carbonate (0.1%) | 29.65 | 3.38 | 0.00097 | 3082361 |
| Calcium hydroxide (0.1%) | 29.91 | 2.67 | 0.0018 | 3055567 |
| Calcium nitrate (1%) | 39.48 | 1.65 | 0.0047 | 2314894 |
| Calcium acetate (0.05%) | 37.11 | 1.98 | 0.0039 | 2462732 |
| Calcium sulfate (0.05%) | 77.31 | 1.06 | 0.0104 | 869046 |
| Calcium oxide (0.05%) | 29.06 | 1.98 | 0.0044 | 186286 |
| Zinc sulfate (0.1%) | 18.73 | 0.86 | 0.0157 | 4879445 |
| Zinc sulfite (0.1%) | 40.15 | 1.79 | 0.0099 | 2276264 |
| Copper oxide (0.05%) | 13.80 | 1.09 | 0.0099 | 6622609 |
| Copper carbonate (0.05%) | 9.45 | 0.91 | 0.0123 | 9671111 |
| Copper phosphate (0.05%) | 27.75 | 0.92 | 0.0120 | 3293405 |
| Potassium carbonate | 7.59 | 0.976 | 0.0131 | 1204110 6 |

في سلسلة من التجارب الحقلية تم تقييم ثلاثة عشر مركب لاستيضاح مقدرتها وكفاءتها كمواد تحمي وتقي البكتريا B.t. من الصنف entomocidus ضد يرقات دودة ورق القطن . لقد كانت هذه المواد هي : البيومين البيض، الخميرة، البيومين البيض + الخميرة ، مستخلص الخميرة ، نشاء، سليولوز، زيت بذرة قطن خام، سليولوز + زيت بذرة قطن خام، اكسيد الومنيوم، shade من ساندوز، shade + بولي ميتثيل.

جدول (٢٥-٤) : تأثير المركبات النتروجينية على كفاءة Bt من الصنف

entomoeidus ضد دودة ورق القطن.

| المركب مع البكتريا BT | LC ₅₀ ug/ml | الانحدار | التباين | الكفاءة ملجم |
|-----------------------|------------------------|----------|---------|--------------|
| Control (B.t.) | ٣٦٠ | ١,٣٠ | ٠,٠١٨ | ١٦٨٨٨٩ |
| L-Tryptophane (0.5%) | ٢٨ | ١,٧٣ | ٠,٠١٣ | ٢١٧١٤٢٨ |
| L-Arginine (0.1%) | ١٠٠ | ١,٦٧ | ٠,٠١٢ | ٦٠٨٠٠٠ |
| (%)Acetamide | ١٥ | ٢,٠٨ | ٠,٠٠٥ | ٤٠٥٣٣٣٣ |

جدول (٢٦-٤) : تأثير الاحماض الامينية والاميدات على كفاءة Bt من الصنف جاليري

HD-234 ضد الدودة القارضة.

| الحمض الاميني المختبر | LC ₅₀ ug/ml | الانحدار | التباين | الكفاءة وحدة دولية ملجم |
|-----------------------|------------------------|----------|---------|----------------------------|
| None (endotoxin only) | 240.70 | 1.421 | 0.0040 | 241961 |
| (DL) Alanine | 52.831 | 0.787 | 0.0174 | 1102383 |
| (DL) Serine | 33.941 | 0.983 | 0.0121 | 1715919 |
| (DL) valine | 33.030 | 0.875 | 0.0129 | 1763246 |
| (DL) tryptophane | 14.891 | 1.322 | 0.0078 | 3911087 |
| (L) proline | 7.658 | 1.435 | 0.0042 | 7605119 |
| (DL) Ornithine | 11.053 | 2.702 | 0.0019 | 4872417 |
| (L) Arginine | 6.017 | 2.263 | 0.0028 | 9679242 |
| (DL) Asparagine | 9.236 | 1.252 | 0.0076 | 6305760 |
| (DL) Glutamine | 8.299 | 1.042 | 0.0001 | 7017713 |
| (DL) Asparic acid | 50.365 | 1.437 | 0.0058 | 1156359 |
| (L) Glutamic acid | 76.412 | 1.041 | 0.0021 | 762184 |

جدول (٤-٢٧): تأثير المواد المذيبة للبروتين على كفاءة Bt من الصنف

entomocidus ضد يرقات دودة ورق القطن.

| المركب الكيميائي مع بكتريا Bt | LC ₅₀ Ug/ml | الانحدار | التباين | الكفاءة وحدة دولية ملجم |
|---|---------------------------|----------|---------|----------------------------|
| Control (B.t.) | 333.0 | 0.17 | 0.422 | 182583 |
| Sodium thioglycollate (1%) | 20.3 | 2.70 | 0.0048 | 2995074 |
| Urea (0.5%) Disodium-B- glycerophosphate (0.05%) | 121 | 2.40 | 0.003 | 502479 |
| Dipotassium hydrogen Phosphate (1%) | 56 | 1.02 | 0.032 | 1085714 |
| | 59 | 0.11 | 0.022 | 1030508 |

الكحول ، شارتنول، لبن بيتونيزد . اظهرت النتائج ان النشاط الالاهي ضد الحشرات لبكتريا B.t. في المقارنة تناقصت تدريجيا من ٩٢% (عندما تقيم مع الاوراق النباتية المرشوشة في الحال) حتي ٤٣% عند استخدام الاوراق المرشوشة بعد ٣ ايام من الرش. معظم المواد الواقية التي اختبرت اظهرت تأثير واقى ولكن بدرجات مختلفة تبعا لنوع المادة المختبرة. لقد اتضح ان نصف فترة حياة مستحضر Bt طالت حتي ٨,٩٧ يوم بعد استخدام اللبن البيتونيزد بتركيز ٥% بالمقارنة مع ٣,٢٨% في المقارنة. المواد التي تحقق حماية من الضوء تختلف في النواحي الكيميائية و الطبيعية. الخميرة ٥% و البيومين البيض ٥% عندما تستخدم منفردة او مخلوطة مع الخميرة ٥% كانت فعالة كواقيات من الضوء وحماية Bt من فقد الفاعلية مع التعرض للاشعة فوق البنفسجية . المركب التجاري Shade لم يزيد من نصف فترة حياة Bt كما ان مخلوطة مع البولي فينيل الكحولى لم يزيد من نصف فترة الحياة للبكتريا كذلك.

REFERENCES

- Dulmage, H.T. (1973). *Bacillus thuringiensis* U.S. Assay standard. Report on the adoption of a primary U.S. reference standard for assay of formulations containing the delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* Bull. Entomol. Soc. Amer., 19, 200-202.
- Hafez, H. Salama, H.S; About-Ela, R. and Ragaei. M. (1987). Evaluation of adjuvants for use with *Bacillus thuringiensis*. Vs. *Heliothis armigera* (Hubn), Z. ang. Ent 103, 313-319.
- El-Nockrashy, A., Salama H.s. and Taha F (1984) Development of bait formulations for control of *spodoptera littoralis* with *Bacillus thuringiensis*. Z. ang. 101-381-389.
- Salama, H.S Foda. M.S. Zaki.f.N. and khalafallah (1983). Persistence of *bacillus thuringiensis* berliner spores in cotton cultivations Z. ang ent., 95, 321-326.
- Salama, H.s. foda M.S. and Sharaby A, (1984). novel biochemical avenues for endotoxin potency against *spodoptera littoralis* (Lep., Noctuidae). Entomophage, 29 (2), 171-178.
- Salama, H.s. foda M.S. and Sharaby A, (1985a). Role of feeding stimulants in increasing the potency of *Bacillus thuringiensis* vs. *spodoptera littoralis*. Entomol. Gener., 10 (2). 111-119.
- Salama, H.s. foda M.S. and Sharaby A, (1985b). potential of some chemicals to increase the effectiveness of *Bacillus thuringiensis* against *spodoptera littoralis*. Z. ang. Ent., 100 425-433.
- Salama, H.s. foda M.S. and Sharaby A, (1986). Possible extension of the activity spectiveness of *Bacillus thuringiensis* through chemical additives. Z. ang. Ent. 101, 304-313.
- Salama, H.s. foda M.S. and Sharaby A, (1989). Potentiation of *Bacillus thuringiensis* endotoxin against the greasy cutworm *Agrotis ypsilon*. J. Appl. Ent. 108, 372-380.

- Salama, H.s. foda M.S. and Sharaby A, (1985c). Application of *Bacillus thuringiensis* and its potency for the control of *spodoptora littoralis* in Egypt. Z. ang. Ent. 99 (4), 425-431.
- Van Mellaert, H. ; Vaan Rie, J.; Hofmann, christina and Reynaerts, A. (1988). Insecticidal crystal proteins from *Bacillus thuringiensis* ; mode of Action and Expreesion in transgenic plants. Proc. Of conference, Biotech. Biological pesticides and novel plant-pest Resistance for insect pest Management, Ithaca, NY, USA, 82-87.

٧- الوراثة والبيولوجيا الجزيئية للباسيلليس ثورينجينسيز.

الوراثة والبيولوجيا الجزيئية للباسيلليس ثورينجينسيز ركزت في البداية على نظم البلازميد المعقد الذي يوجد بالضرورة في كل سلالات هذا الكائن وكذلك على العلاقة بين البلازميدات والتوكسينات الالابدية للحشرات التى تنتج بواسطة هذه السلالات المختلفة. النقطة الاولى التى يسهل تمييزها محدودية البلازميدات في العديد من العزلات الطبيعية المختلفة للبكتريا وتباينها في العدد وتوزيع الحجم. السلالات المختلفة قد تعول من ٢ وحتى ١٤ او اكثر من البلازميدات ذات الحجم المختلفة. بلازميدات بكتريا B.t. موجودة في حركة ديناميكية في تغير مستمر. لقد تحصل على ادلة من المعامل المتعددة من جراء دمج او خلط الاقترابات المعنية بما فيها علاج وتغيير البلازميد ونقل البلازميد وتحليل ساوثرن مع الجينات المشفرة للتوكسين مما ادي لعمل استنتاج عام مفاده ان جينات التوكسين الالابدية للحشرات في السلالات المختلفة عادة تقع على واحد او اكثر من البلازميدات وليس على الكروموسوم. بسبب بعض الاسباب غير المعلومة فان البلازميدات التى تحمل جينات الدلتا-اندوتوكسين تكون كبيرة تتراوح من ٤٤ M دالتون وحتى ١٣٠ M دالتون في الحجم بينما البلازميد الاصغر للتوكسين يساوي ٢٩ M دالتون بلازميد HD-1 (Minnich and Aronson ١٩٨٤). هكذا قدم د. محمد على بقسم الهندسة الوراثية والتكنولوجيا الحيوية بالمركز القومي للبحوث - مصر.

بلازميدات التوكسين قد تتكامل في الكروموسوم بينما تحتفظ بالتعبير عن جين التوكسين ومن ثم يزال من الكروموسوم لخلق بلازميدات توكسين جديدة ذات احجام جديدة (كارلتون وجونزاليس ١٩٨٥ أ وب). السلالات التى تحتوي على بلازميدات توكسين متكاملة قد تكتسب بلازميدات توكسين اخري عبر عملية النقل الطبيعي للبلازميد. ان فهم وراثية انتاج توكسين B.t. تقدم بشكل كبير خلال اوائل الثمانينيات. جينات

التوكسين تقع على بلازميدات خاصة انتقلت من سلالة لاخري وسلالات عديدة التابع في جينات التوكسين المشفرة بدأ والطريق اصبح مفتوحا الان للمناورات الاخري الوراثة لجينات التوكسين سواء كانت مكلونة او في الحالة الطبيعية. بلازميدات Bt فائقة العدد ذات جينات التوكسين والانتقال علاوة على مقدرتها على الدمج وامكانيات الترجمة و الغرس لابد وان تفتح مجالات جديدة ومثمرة في اتجاه البحوث الاساسية والتطبيقية في السنوات القادمة.

استخدام بكتريا Bt في مكافحة الحيوية للافات اظهرت بعض الصعوبات في الدول النامية وهذه يمكن حلها عن طريق طرق واقترايات الهندسة الوراثية. بعض البرامج البحثية اجريت مستهدفة النواحي التالية:

- ١- الحصول على سلالات ذات فاعلية عالية في مكافحة الافات.
- ٢- الحصول على سلالات سابقة دون فقد او خفض في الفاعلية بواسطة الاشعة فوق البنفسجية والحرارة وغيرها من العوامل الاخري.
- ٣- انتاج انواع مختلفة من بكتريا Bt متخصصة على مجاميع مختلفة من الافات.
- ٤- تقليل تكاليف الانتاج.
- ٥- حل مشكلة والتغلب على ظاهرة المقاومة ضد الاندوتوكسين.
- ٦- تطوير نظم ميكروبية رخيصة لتقدير فعالية بكتريا Bt ضد مختلف الحشرات.
- ٧- تطوير نظم مكافحة الحيوية للفطريات و البكتريا المرضية.

في المرحلة الاولى تم اختيار مستعمرات فردية من سلالات Bt المقاومة للحرارة العالية والاشعة فوق البنفسجية UV بعد تعريضها لدرجات حرارة عالية او UV وكذلك من خلال ادخال جينات غريبة من انواع الباسيلليس التي تتحمل ، ثم والتي كانت قد عزلت من تربة محافظة اسوان - مصر. لسوء الحظ تحصل على نقص في كفاءة مكافحة

الافات مع هذه السلالات وقد عزي هذا النقص الى فقد البلازميدات التي تحمل جين الاندوتوكسين او حدوث خلل ما في بعض النواحي الوراثية بواسطة الجينات الغريبة. المرحلة الثانية تناولت عزل السلالة المقاومة للكاناميسين (تقاوم ١٠٠ مللجم كاناميسين/ ١٠٠ ملليمتر وسط) والتي اثبتت ان هذا الجين يرتبط بجين الاندوتوكسين ويقع على نفس البلازميد. نهو هذه السلالات في البيئة المضاف اليها كاناميسين سوف يزيد من محتويات البلازميد في الخلايا ومن ثم تزيد من كفاءة انتاج الاندوتوكسين.

جين اندوتوكسين Bt تم كلونته في سلالة ازوتوباكتر كروكوم. المتحولات عن طريق النقل transformants التي تكتسب هذا الجين في الكروموسوم تم عزلها. لقد وجدت هذه المتحولات ذات فاعلية ثابتة حيث الجين يقع في الكروموسوم وليس في البلازميد الذي تعرض للعلاج والفقء. هذه المتحولات وجدت قادرة على تثبيت النتروجين ويمكن ان تستخدم في مكافحة الافات والتسميد. لقد كان في الامكان استخدام سلالات بكتريا Bt العائلة كفيروس البوليهيدروزيس وقد ادي ذلك لزيادة فاعليتها. لقد اصبح ممكنا عزل البوليهيدروزيس من بعض سلالات بكتريا Bt. عدوي هذا الفيروس في Bt يزيد كفاءتها بواسطة عزل السلالات الليسوجينيك. لقد تاكد ان هذه الفيروسات يمكن ان تفقد من الخلايا من خلال تحفيز التحلل Lysis بواسطة الاشعة فوق البنفسجية او أي مادة اخري. من هذا الفهم تم وضع طريقة جديدة عن طريق ادخال الحمض النووي "DNA" للفيروس على الخلايا فقط. لقد وجد ان هذا الاسلوب سوف يوقف أي تحفيز في التحلل فقط ولكن يكسب خلايا البكتريا مقاومة تمكنها من قبول أي فيروس او حمض "DNA" غريب.

الفاج الذي يحمل جينات الاندوتوكسين تم عزله من بكتريا B.t. لقد استخدم الدنا الفيروسي الذي يحمل جينات الاندوتوكسين لتحويل الازوتوباكتر كروكوم. لقد ساعدت هذه الطريقة في ادخال الجينات في الكروموسومات. لقد وجد ان المتحولات كانت ثابتة وعالية

الفاعلية في مكافحة الآفات. لقد وجدت فعالة في مكافحة الحيوية لبعض الممرضات الفطرية مثل سيكليروشيوم وريزوكتينا وفيوزاريوم واسبرجللس والترناريا وبنسيليوم. هذه الطريقة يمكن ان تستخدم كذلك في تقرير فعالية بكتريا Bt هذه الطريقة تمكن من تغيير انواع Bt عن طريق ادخال جينات غريبة من المصادر المختلفة مثل ستربتومايسيس يثرموفيرديس. يمكن عمل انتاج رخيص من بكتريا Bt من خلال تخمر مركبات سليلوزية ثانوية مع كائنات دقيقة متخصصة وتنمية سلالات Bt في منتجات تخمر بعد التعقيم. في العديد من الحالات كان نمو Bt ناجحاً.

REFERENCES

- Carlton, B.C. and Gonzalez, J.M. (1985a). the genetics and molecular biology of *Bacillus thuringiensis*. In : Molecular Biology of the Bacilli. London : Academic press, 211-289.
- Carlton, B.C. and Gonzalez, J.M. (1985b). plasmids and delta-endotoxin production in different subspecies of *Bacillus thuringiensis*. In. Molecular biology of microbial differentiation (Eds. By. J.A. Hoch and P. Setlow), A. soc. For Microbiology, Washington , D.C., 252-264.
- Minnich, S.A. and Aronson, A.I. (1984), Regulation of protein synthesis in *Bacillus thuringiensis*. J. Bacteriol., 158, 447-454.

٨- تطوير طريقة ELISA جديدة لقياس تركيز الدلتا-اندوتوكسين الذي ينتج بواسطة

الباسيلليس ثوريينجيسيز Bt.

خلال العمل المبكر على الباسيلليس ثوريينجيسيز Bt عن طريق التخمير اتضح ضرورة الحاجة الى اختبار الكشف عن الدلتا-اندوتوكسين كعمل روتيني في المعامل. حتي ذلك الوقت كانت الطريقة القياسية لتقدير وجود الدلتا-اندوتوكسين في تخمر بكتريا Bt هي التقييم الحيوي للناتج النهائي للتخمير. لا توجد قياسات لتركيز الدلتا-اندوتوكسين خلال التخمير متاحة في المراجع العلمية. لقد اشير فقط الى الملاحظات الميكروسكوبية للوقوف على وجود الاجسام البارسبورية مثل بلورات الدلتا-اندوتوكسين. التقييم الحيوي ليس مناسباً كي يستخدم في الاختبارات الروتينية لانها تتطلب تربية الحشرات واليرقات والتي تتطلب وقتاً طويلاً وتكاليف باهظة. التقييم الحيوي يعاني من عدم الدقة ونقص ثبات تكرارية النتيجة reproducibility كما لا يستخدم على اساس مقارنة مع درجات كبيرة من التحليل الاحصائي للتأكد من غياب اخطاء اساسية. تمثل النتائج على صورة قيم الجرعات النصفية القاتلة LD50 وهي الجرعة المطلوبة لاحداث الموت في ٥٠% من يرقات الحشرات المختبرة.

نحن في حاجة لطريقة بسيطة تستخدم بشكل روتيني بدلا من تعريض كل عينة لاختبار التقييم الحيوي وتقدير LD50 قمنا باختبار تطوير طريقة خاصة بنا عن Elisa لقياس الدلتا-اندوتوكسين. استخدام الطريقة التي تعتمد على الاليزا لقياس تركيزات الدلتا-اندوتوكسين في ناتج تخمر Bt كوظيفة لوقت التخمير الحقيقي لم تجد طريقها للمراجع حتي كتابة هذا المقال منذ عشر سنوات. هذا الاختبار قد يكون له تاثير معنوي على جودة انتاج الدلتا-اندوتوكسين وقد تكون اساس هذا الاختبار القياسي الجديد للكشف عن وجود الدلتا-اندوتوكسين لبكتريا Bt. اختبار اليزا Elisa لايحل محل اختبارات السمية على حساسية

كائن حي معين ولكنه يسمح بسرعة الاختبار مع حجوم صغيرة من العينات على اساسي روتيني. حيث ان اختبار الاليزا حساس جدا مع مقدرة عن الكشف عن نانوجرامات قليلة من الدلتا-اندوتوكسين في كل ملليمتر بيئة التخمر فانه يمكن الكشف عن الانتاج المبكر في المراحل الاولى من التخمر للدلتا-اندوتوكسين(من مقالة البحات A.Margaritis, J. Kosir and D. te Bokkel). عندما يتحقق توفير الكاشف الحيوي biosensor للكشف عن الدلتا-اندوتوكسين في معامل البحات كاتبي المقال فانه سوف يجعل من الاستكشاف السريع في العمل الروتيني لهذه المادة امرا سهلا (Margaritis وآخرون ١٩٩١-أ). هذا يسمح باستكشاف تأثير استراتيجيات تغذية التخمر على انتاج الدلتا-اندوتوكسين بشكل اكثر سهولة.

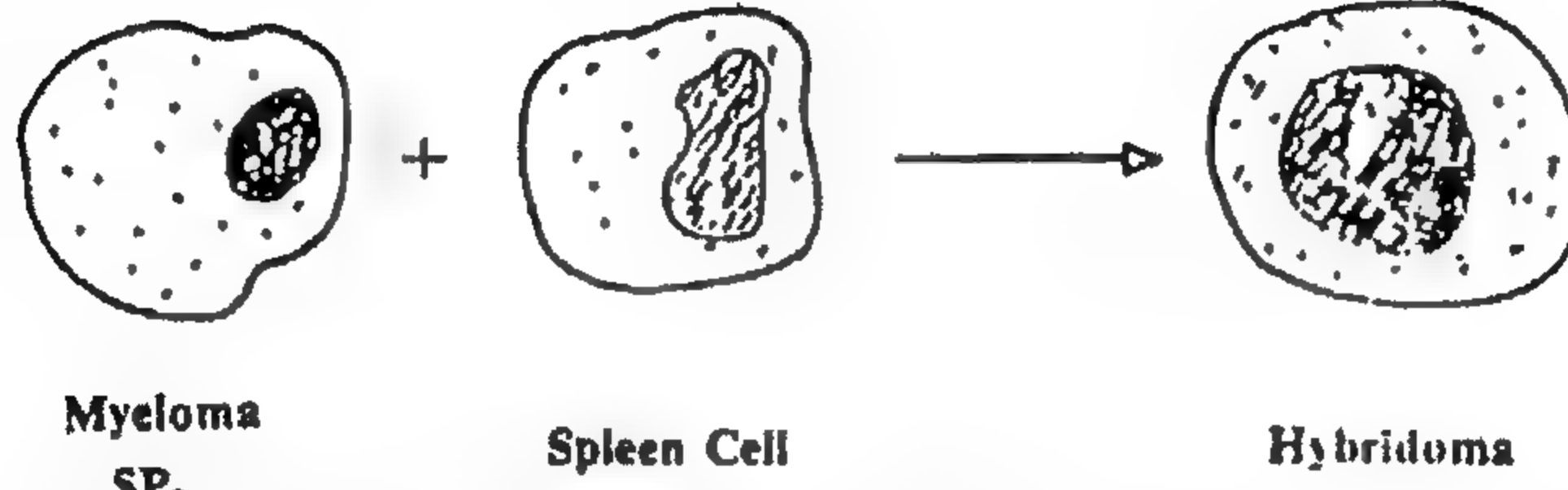
لقد امكن تطوير اقترابان للاليزا : الاول تضمن انتاج الاجسام المضادة عديدة الكلونة للارانب لاذابة الدلتا-اندوتوكسين لبكتريا Bt سلالة HD-1 (kosir ١٩٨٩) ٩. تستخدم هذه الاجسام المضادة لاختبار عينات من التخمر لتحديد تركيز دلتا-اندوتوكسين. الاقتراب الثاني تمثل في تطوير حظ خلايا هيبريدوما hybridoma تنتج جسم مضاد وحيد الكلونة متخصص ضد الدلتا-اندوتوكسين. في هذا المقام سوف نوضح خطوات تحليل عينات من تخمر Bt بواسطة د. مورييس من كندا والزملاء في المركز القومي للبحوث في مصر على تجهيز خاص من بلورات الدلتا-اندوتوكسين.

تطوير خط خلايا هجينية "هيبريدوما" لانتاج الجسم المضاد وحيد الكلونة

لقد تم احداث المنة في العديد فئران BALB/C بواسطة بلورات الدلتا-اندوتوكسين المذابة بالقلوي و المنقاة من البكتريا Bt كورسناكي HD-1 في التخمر. طحال كل من هذه الفئران تدمج مع خط خلايا الاورام SP2 في الفئران باستخدام البولي ايثيلين

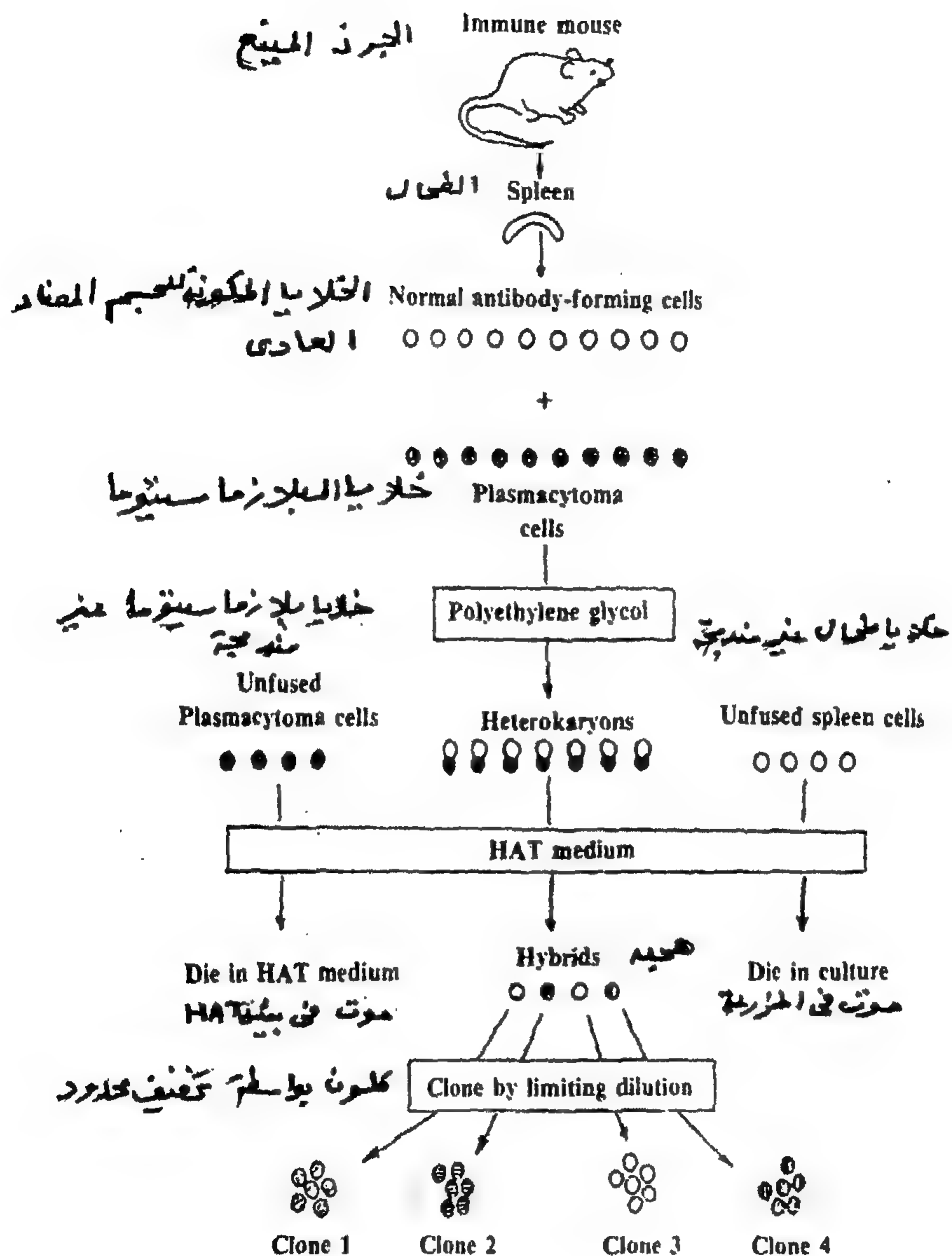
جليكول (PEG) والهيپوزانسين امينوثيرين ثيميدين (HAT) في البيئة المختارة تبعا لطريقة de sd. Groth and scheidegger (١٩٨٠) مع بعض التحوير الشكل (٦-٤) يوضح الخطوات العامة لدمج خلية الهيبريدوما .

Development of Hybridoma Cell System



شكل (٦-٤) : دمج خلية الورم Myeloma مع خلية الطحال المنبوعة لخلق جسم مضاد وحيد الكلونة منتجا خط خلية هيبريدوما.

الشكل (٧-٤): يوضح الخطوات التفصيلية لدمج الخلية والهيبريدوما في عملية الانتخاب تفاصيل هذه العملية موجودة في مواضع كثيرة (Margaritis وآخرون ١٩٩١-b) وكذلك عملت تحت كلونة للخلايا المدمجة وتم الانتخاب للسلالة التي تنتج الاجسام المضادة وحيدة الكلونة خاصة ضد دلتا-اندوتوكسين كما ذكر سابقا. بمجرد الحصول على العزلة المناسبة فانها تزرع في بيئة دليبيكوالمحولة (DMEM) لزراعة الانسجة ويتم حفظ عينات سائلة تحت التجمد في النيتروجين السائل.



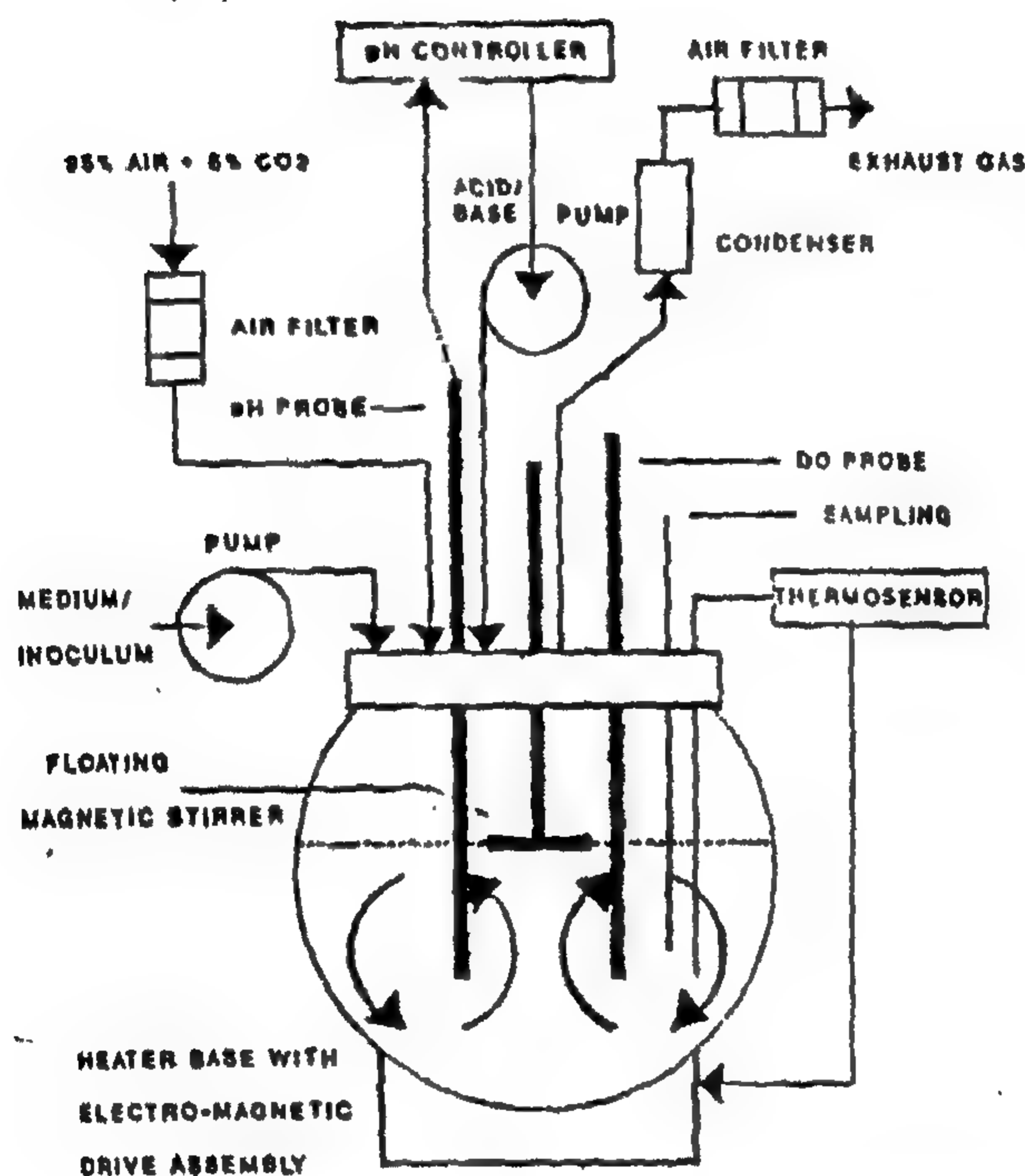
شكل (٧-٤): رسم تفصيلي لبروتوكول دمج الخلايا وعملية خط خلية الهيبرويدوما والانتخاب.

إنتاج الجسم المضاد وحيد الكلونة ضد الدلتا-أندوتوكسين

لقد تم عمل اقترابان لإنتاج الجسم المضاد: الأول تخمير الدفعة batch في نظام فعال حيوي قليلة الجز والثانية تشمل إنتاج الجسم المضاد في شبة دفعات في نظام فعال حيوي به غشاء خلوي غير متحرك. في كلا النظامين للمفاعلات الحيوية bioreactor كان يستخدم خلايا الهيبريدوما الجديدة. المفاعل الحيوي قليل الجز Low shear يستخدم لدراسة تأثير تركيز سیرم جنین البقر (FBS) على إنتاج الجسم المضاد. كان التخمير يجري في نظام المفاعل الحيوي كما في الشكل (٤-٨). لقد ضبطت الحرارة على ٣٧°م و الحموضة على ٧,٢٥. كان يتم تشغيل الدافع في وحدة الجز القليل على ٩٠ لفة في الدقيقة rpm ثم تخطط مكونات المفاعل. يتم إجراء تهوية على السطح باستخدام مخلوط من ٥% ثاني أكسيد الكربون و ٩٥% هواء. يتم حقن المفاعل الحيوي بعدوي ١٠% تحتوي على ١٠^٦ خلية/ملليمتر. يتم استكشاف تركيزات الجسم المضاد الناتج باستخدام طريقة الاليزا الجديدة. يتم تقدير الجلوكوز واللاكتات والجلوتامين والامونيا انزيميا بواسطة وحدات التشخيص من شركة سيجما كما يتم تقدير الخلايا الكلية والحيوية ميكروسكوبيا باستخدام جهاز عد كرات الدم هيموسيتوميتر hemocytometer وكذلك اختبار صبغة تريبان الزرقاء. يتم قياس الاكسجين الذائب باستخدام محبس Do البولارجرافي.

الشكل (٤-٩) يوضح تركيز الخلايا الحية النشطة على امتداد عملية التخمير في المفاعل الحيوي قليل الجز. تجد الملاحظة ان تركيز الخلية الحية النشطة كانت اكبر من ١,٢٥% مع بيئة FBS. بيئة هذا المستحضر تبني وتعتمد على اساس بيئة خالية من السیرم يطلق عليها (Gibco) Opti-MEM ان البيئة المقواه الاضافية FBS ٢,٥%، ٥% كانت تبني وتعتمد على البيئة القياسية DMEM. استخدام ١,٢٥% FBS مع بيئة DMEM ادي الى الحصول على حيوية فقيرة ونمو خلوي بطيء التغير في اساسي البيئة

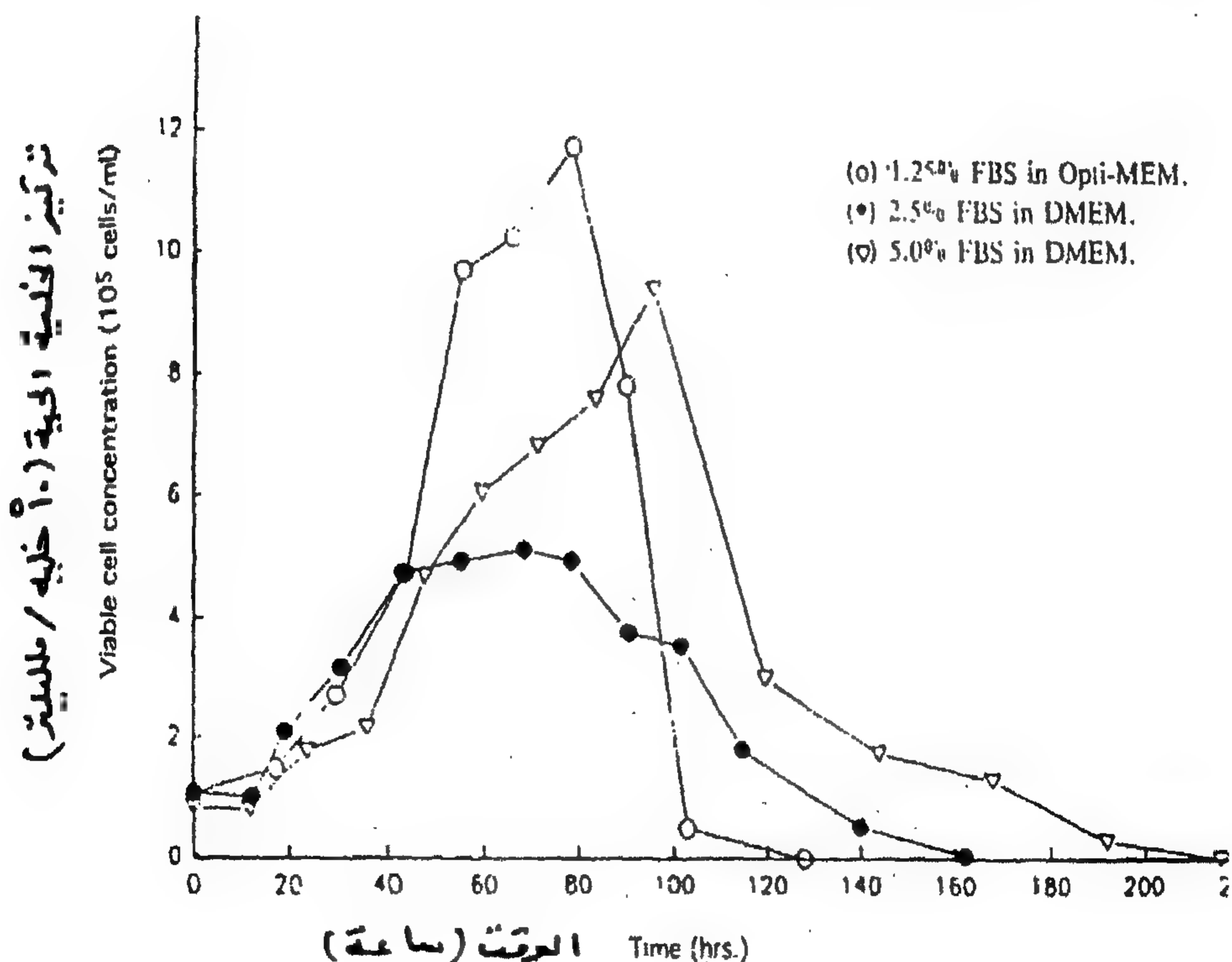
تسمح باضافات اكثر قلة FBS مع اقل فقد في انتاج الجسم المضاد. الشكل (٤-١٠) يوضح ان ١,٢٥% بيئة FBS OPTI-MEM ينتج اجسام مضادة بسرعة كبيرة وعند مستوي اقل قليلا من ٠,٥% فقط من انتاج بيئة FBS DMEM. هذا يسمح بتقليل اضافات FBS بدون فقد يذكر في انتاج الجسم المضاد وحيد الكلونة.



شكل (٤-٨) : رسم توضيحي عن نظام المفاعل الحيوي قليل الجز

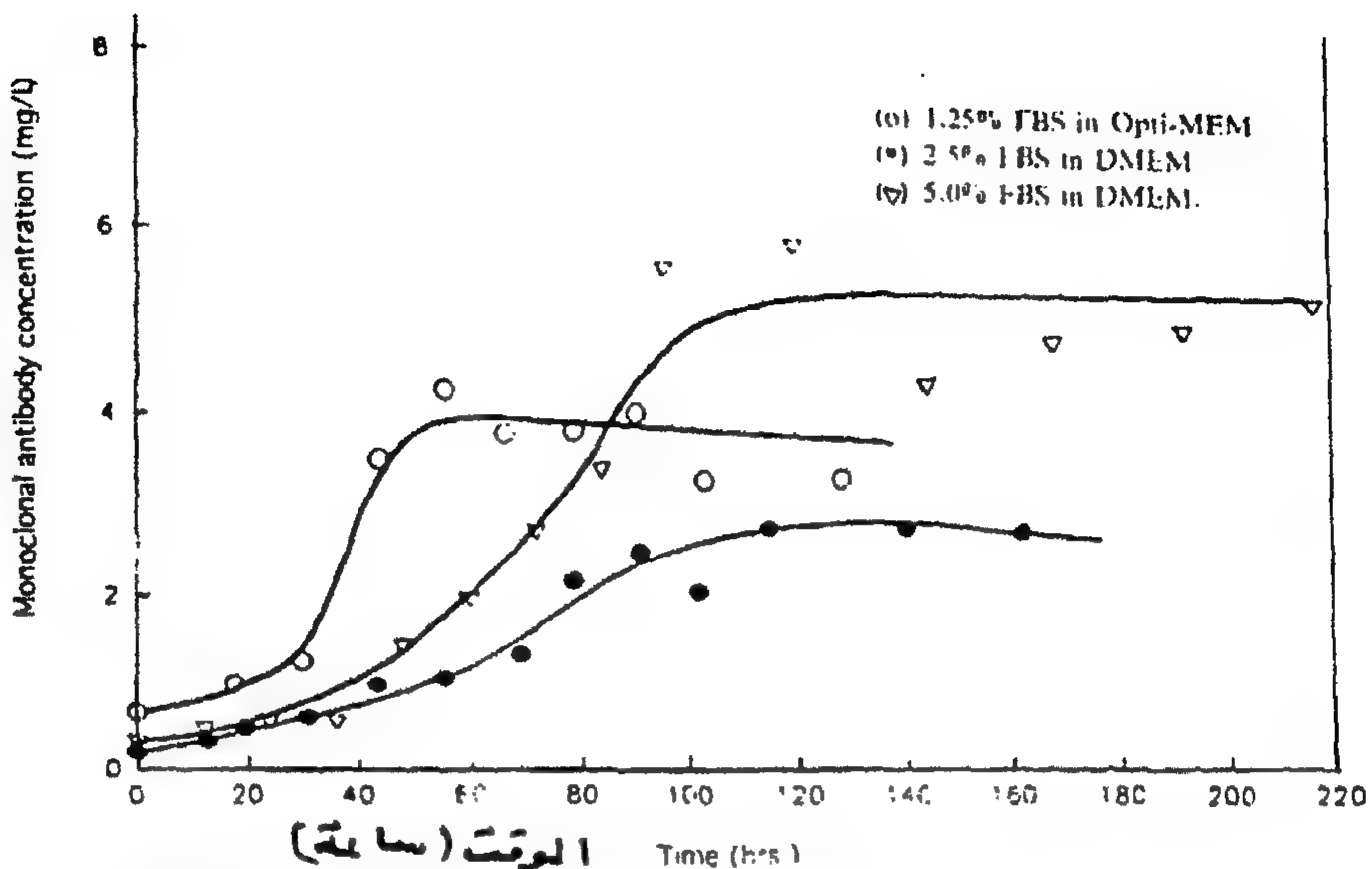
نظام المفاعل الحيوي ذو الغشاء غير المتحرك موضح في الشكل (٤-١١) والذي يتكون من الوحدة القياسية للخلايا غير المتحركة، انبوب تبادل الغازات، مضخة التدوير الوسيطة، مستودع البيئة. البيئة المستخدمة في هذا النظام تنظم على درجة حموضة ٧,٤ وتضبط الحرارة على ٣٧م في ٦% ثاني اكسيد الكربون في الحضانة. وحدة الغشاء موضحة في الشكل (٤-١٢) وهي تحمل مع الخلايا بداية ٤ X ١٠^٦ الخلايا تصطاد بين غشائين والتي تسمح بمرور المواد المغذية والتخلص من النفايات والنواتج يتضمن الجسم

وحيد الكلونة الناتج بواسطة الخط الخلوي. الحجم الكلي الداخلي لمكونات الخلية كان ٨٠٠ ميكروميتر. تركيزات الجسم المضاد وحيد الكلونة كانت تستكشف على اساس مستويات الجلوكوز، لاكتات، جلوتامين، امونيا، وعاء الوسط المغذي كانت تغير كل ٣-٤ أو ٦-٧ يوم اعتمادا على مستحضر الوسط. وسط DMEM استخدمت حتي ٤٠ يوم بعد استخدام مستحضر بيئة Opti-MEM الشكل (٤-١٣) يوضح مستويات انتاج الجسم المضاد خلال الدورات المختلفة للنظام. لقد تم انتاج ١٣٠ ملليجرام من الجسم المضاد وحيد الكلونة ضد دلتا-اندوتوكسين على امتداد ٣٨ يوم.

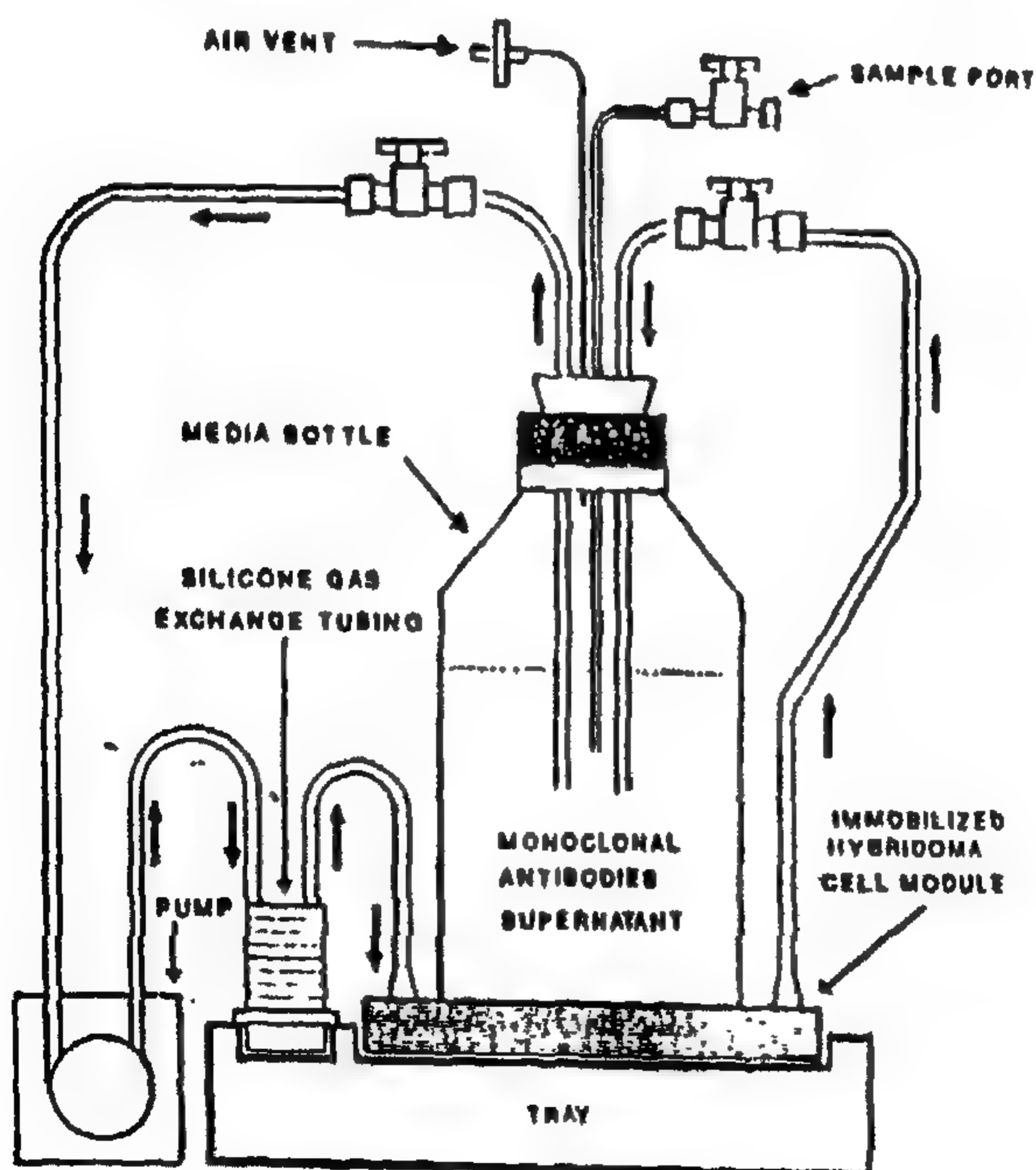


شكل (٤-٩) : بيانات حركية التركيز الخلوي للهيبريدوما الحيوية من نظام المفاعل الحيوي قليل الجز.

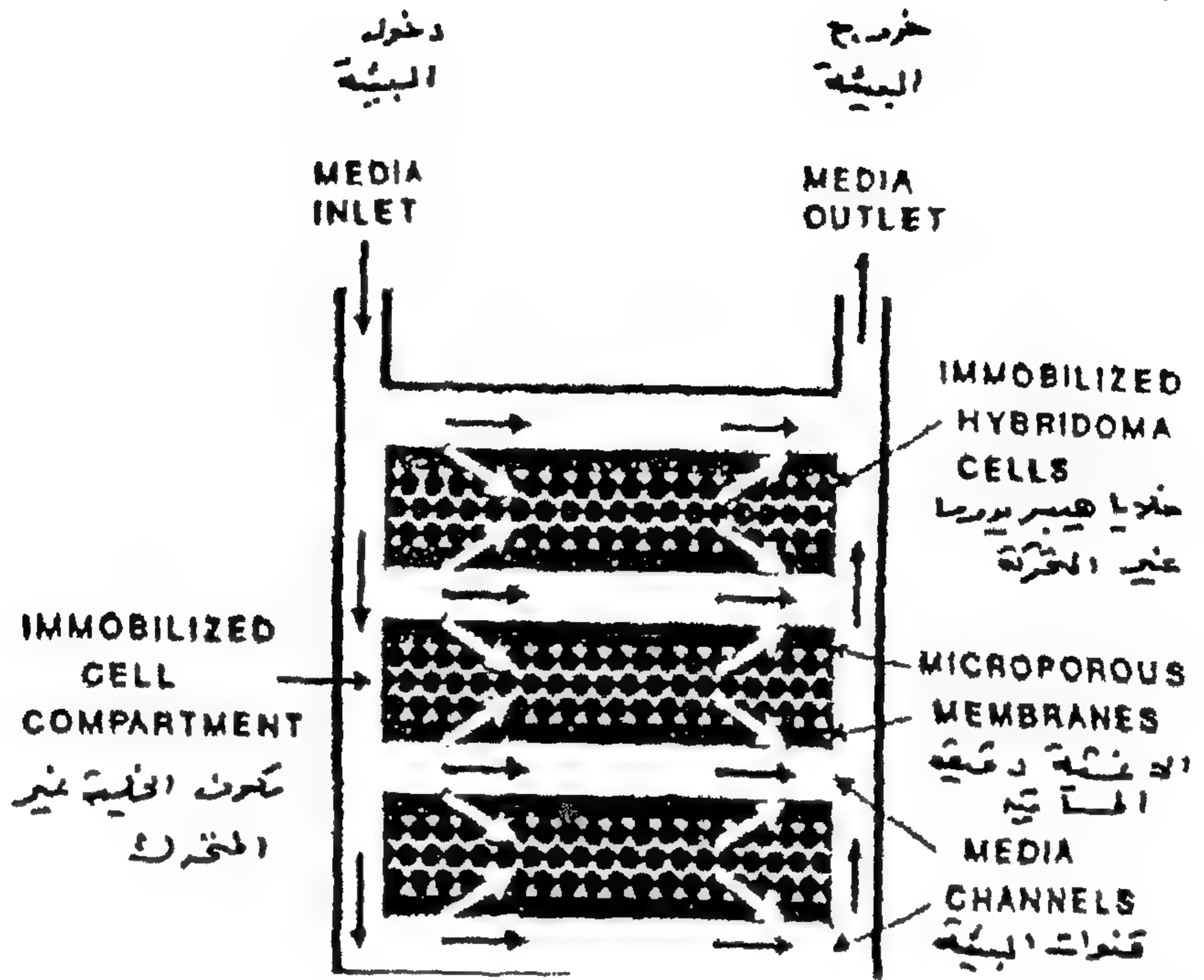
تركيز الجسم المضاد وحيدة الكلوننة
(مليغرام / لتر)



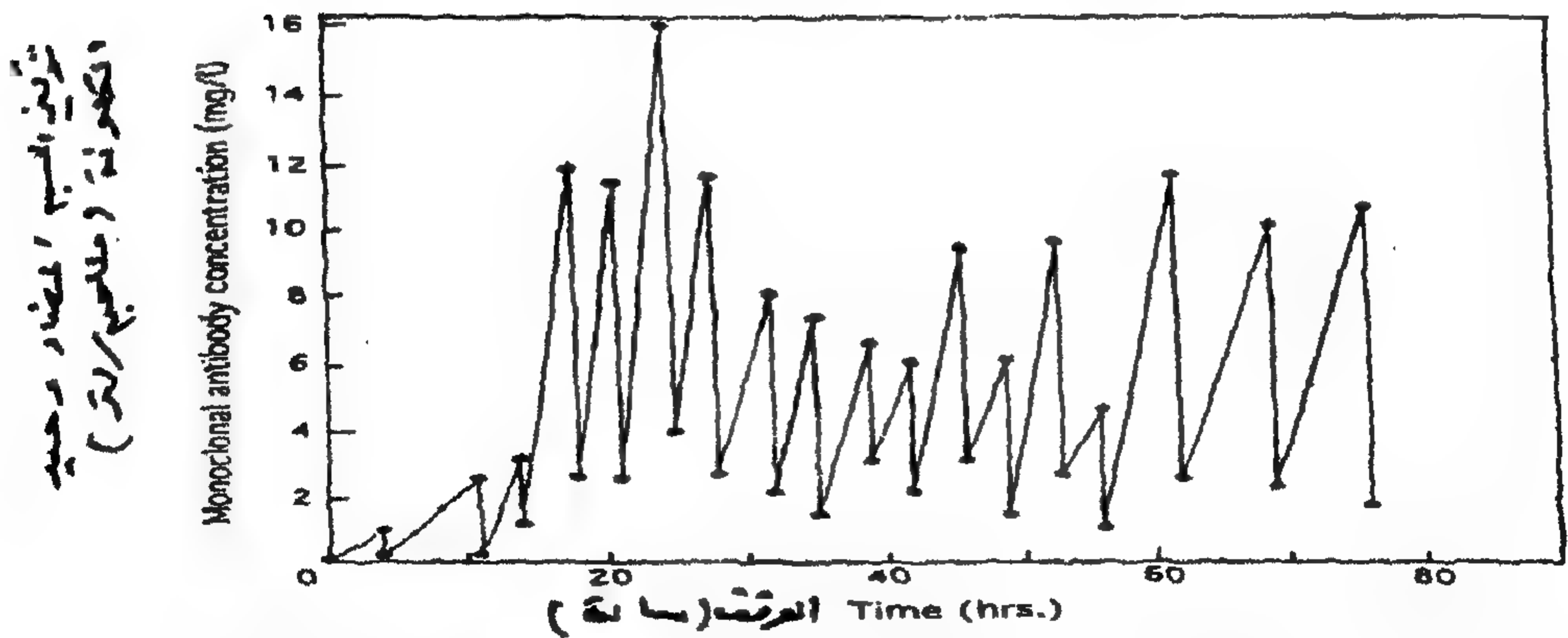
(١٠-٤) : بيانات حركية انتاج الاجسام المضادة وحيدة الكلوننة من نظام المفاعل.



شكل (١١-٤): رسم توضيحي لنظام المفاعل الحيوي لخلايا الهيبريدوما غير المتحرك



شكل (٤-١٢): تفاصيل الغشاء الخلوي غير المتحرك.



شكل (٤-١٣): بيانات حركية إنتاج الجسم المضاد وحيد الكلونة من النظام المفاعل

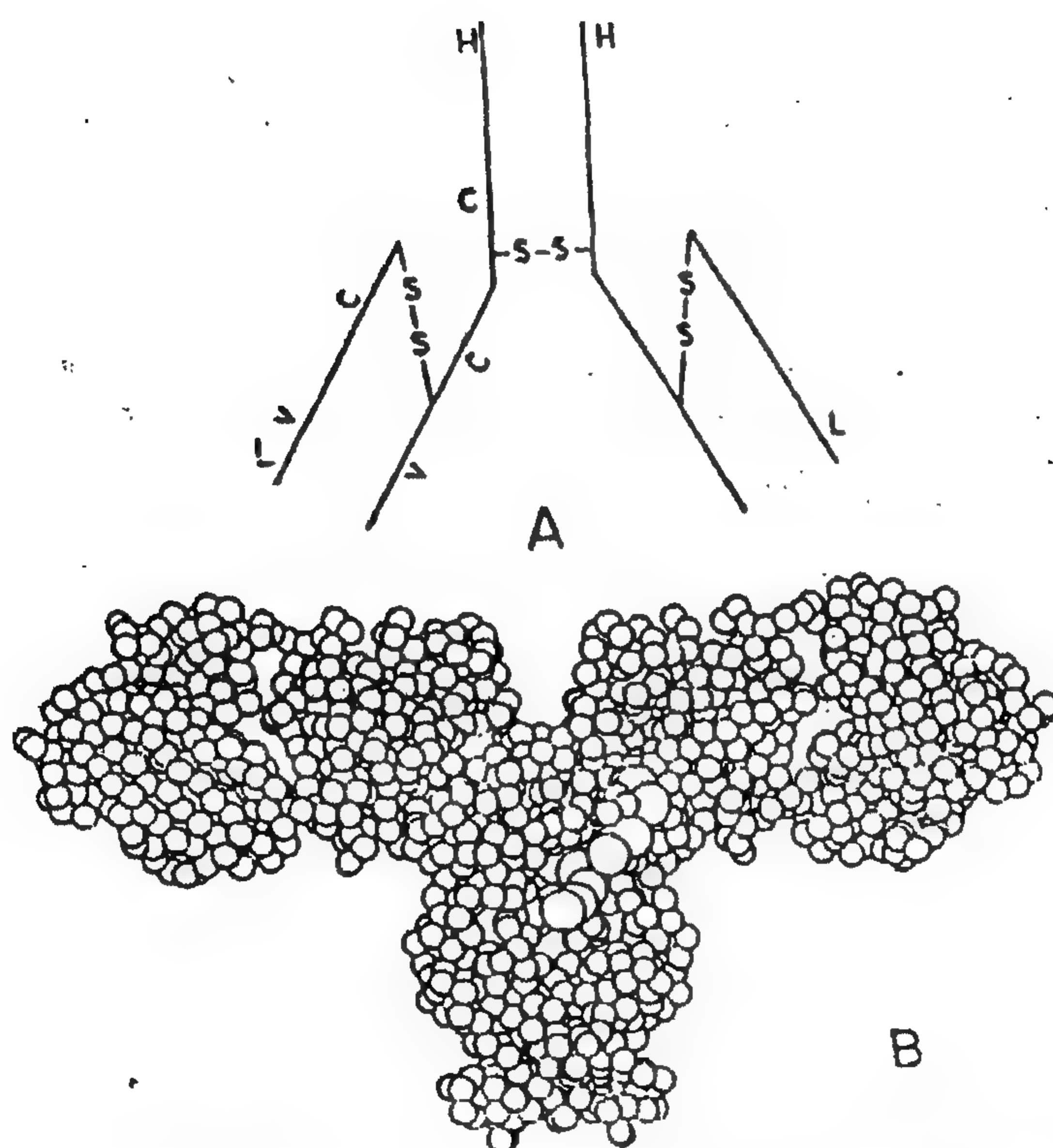
الحيوي لغشاء الخلية.

تطوير طريقة اليزا جديدة لقياس دلتا-اندوتوكسين

الرسوم التوضيحية لتركيب الجسم المضاد موضحة في الشكل (٤-١٤). جزيئات الجسم المضاد الاحادي monomeric تتكون من سلسلتان ثقيلة واثنين خفيفة وكلاهما فيه مناطق متغيرة واخرى ثابتة. نموذج ملأ الفراغ الخاص بالجلوبيولين المناعي G(IgG) اظهر الطبيعة المتفرعة لهذا البروتين المعقد الخاص بالمناعة الجينية. نشاط الاجسام المضادة من كائن واحد ضد اجسام من كائن اخر تعتبر المفتاح لتطور اليزا الجسم المضاد غير المباشر. في حالتنا هذه تم ارتباط جسم مضاد IgG للفأر من الماعز مع صور البيوتين ومن ثم تكون اساس نظام التفاعل اللوني الذي يرتبط مع تركيز الجسم المضاد او تركيز الانتيجين اعتمادا على أي صورة اختبار استخدمت.

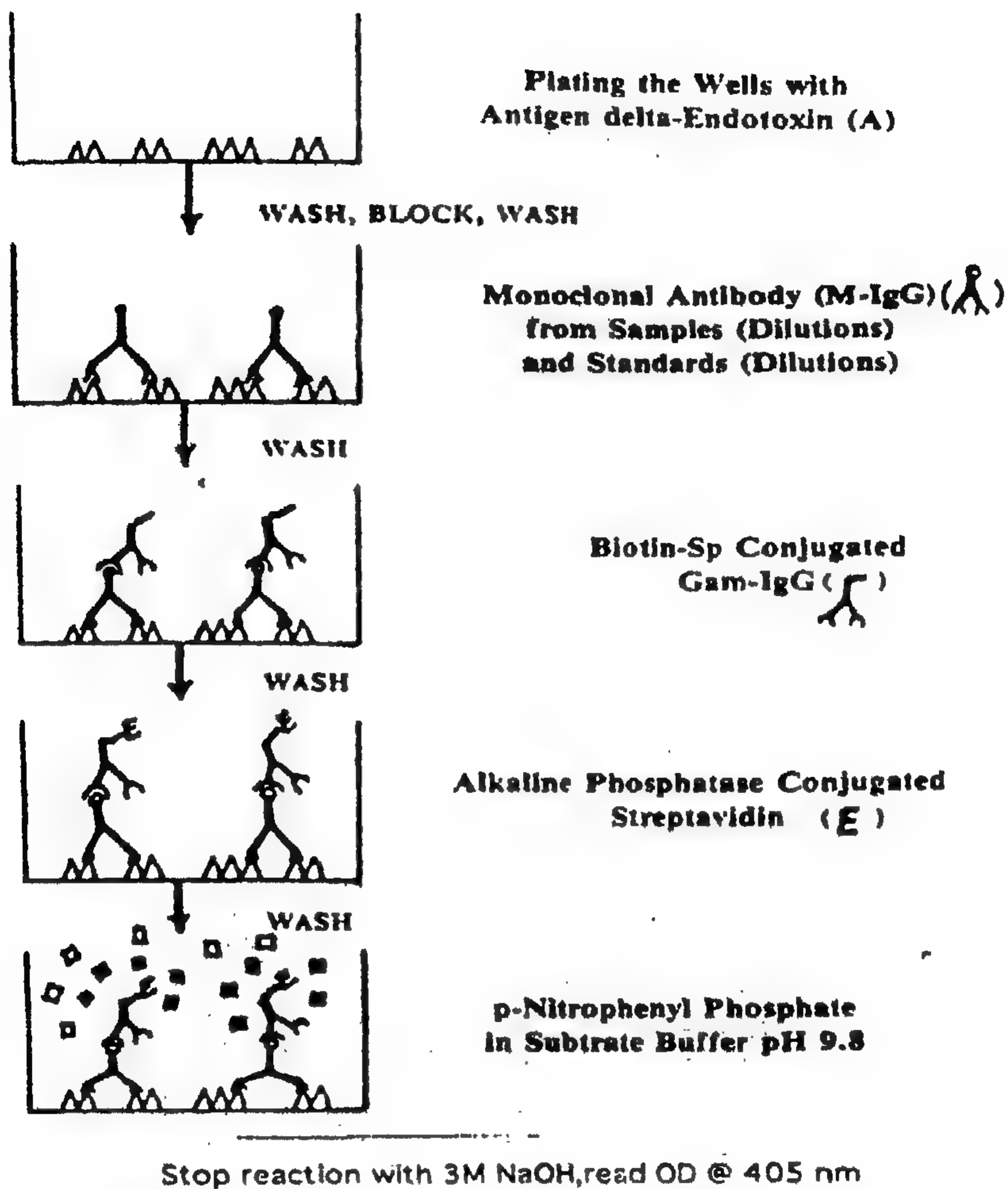
اختبار الاليزا لقياس تركيز الجسم المضاد موضح في الشكل (٤-١٥): في البداية يتم تغليف الطبق الدقيق بالبولى استيرين مع بلورات منقاه ومذابة في القلوي من الدلتا-اندوتوكسين مع تركيز ٥٠ ميكروجرام دلتا-اندوتوكسين / ممر . يتم التحضين لمدة ١٨ ساعة على درجة ٥٠ ثم يغسل منظم الفوسفات ثلاثة مرات. بعد ذلك يتم سد الطبق بواسطة ١% جيلاتين في محلول منظم لازالة أي ارتباط غير متخصص للجسم المضاد في الطبق. بعد ساعة تحضين وثلاثة غسلات اخرى يتم تحميل الطبق مع سلسلة من التخفيفات كعينات من الجسم المضاد احادي الكلونة و المواد القياسية ثم تحضن لمدة ٤-٦ ساعات على درجة حرارة الغرفة. بعد ذلك تجري ثلاثة غسلات بمنظم الفوسفات او مولر مع درجة حموضة ٧,٢ يتم اضافته البيوتين المعلم للماعز و IgG و المضاد للفئران الى المجاري وتحضن طول الليل على درجة حرارة ٤٠ م . المجاري تغسل مرة اخرى ثم يضاف الكالايين فوسفاتيز المرتبط بالاستربا فيدين الى المجاري و تحضن على درجة ٣٧ م لمدة ساعتان بعد الغسيل يتم اضافة البار-ينجروفيتايل فوسفات (١ ملليجرام/ملليمتر)

كوسيط في ٩,٧% داي ايثانول امين كمنظم على درجة التفاعل باضافة ٥٠ ميكروليتر ٣
 مولر سودا كاوية لكل مجري . يلاحظ ان كل المحاليل قد اضيفت بمعدل ١٠٠ ميكروليتر
 لكل مجري . التغير في اللون يقاس باستخدام مسجل طبعة الاليزا Titertek Multiscan
 (PLUS) على ٤٥٠ نانوميتر.



- (a) The monomeric antibody molecule consists of two heavy (H) chains and two light (L) chains. Both have variable (V) and constant (C) regions.
 (b) Molecular model of IgG.

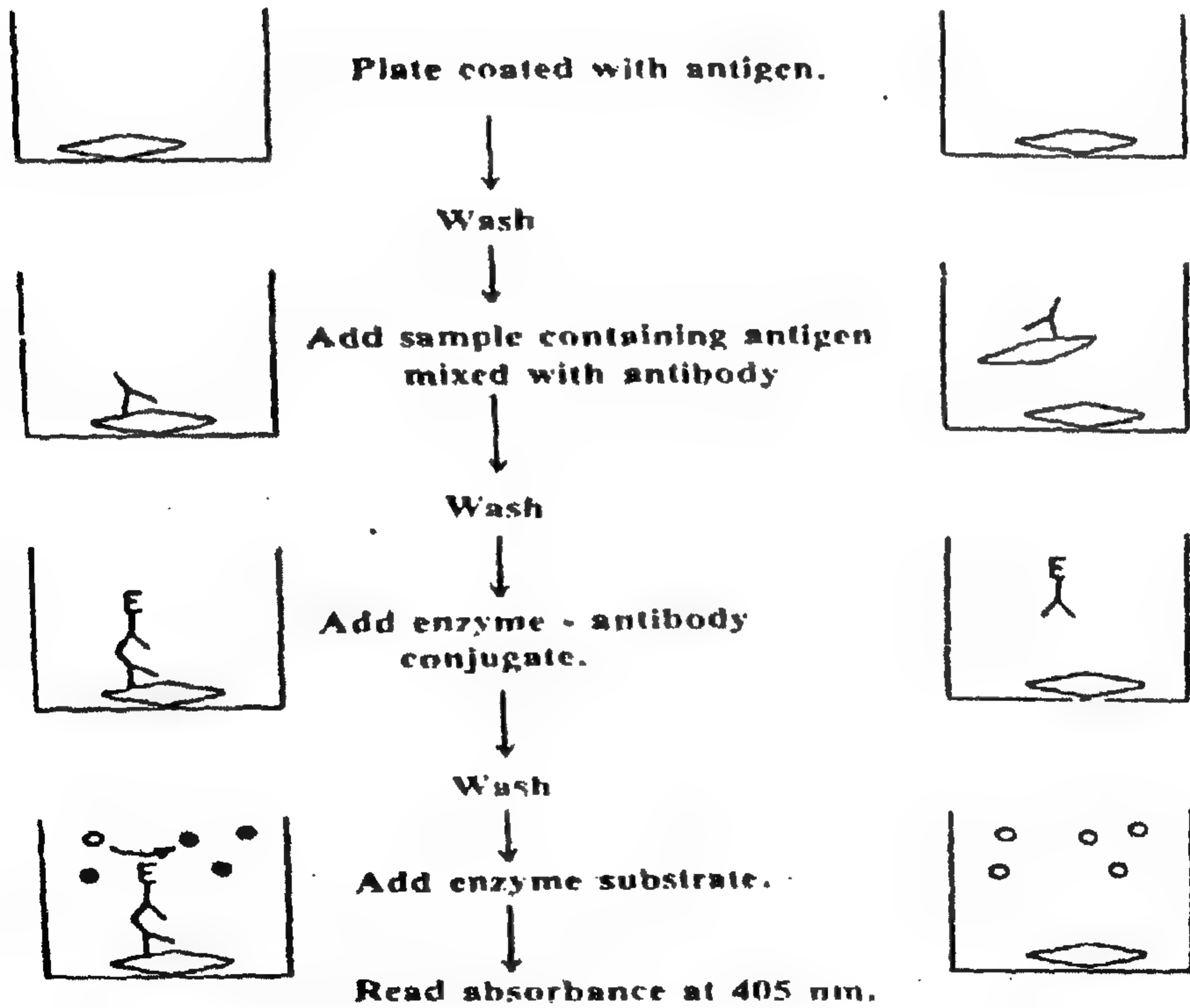
شكل (٤-١٤) : رسم توضيحي يمثل تركيب IgG



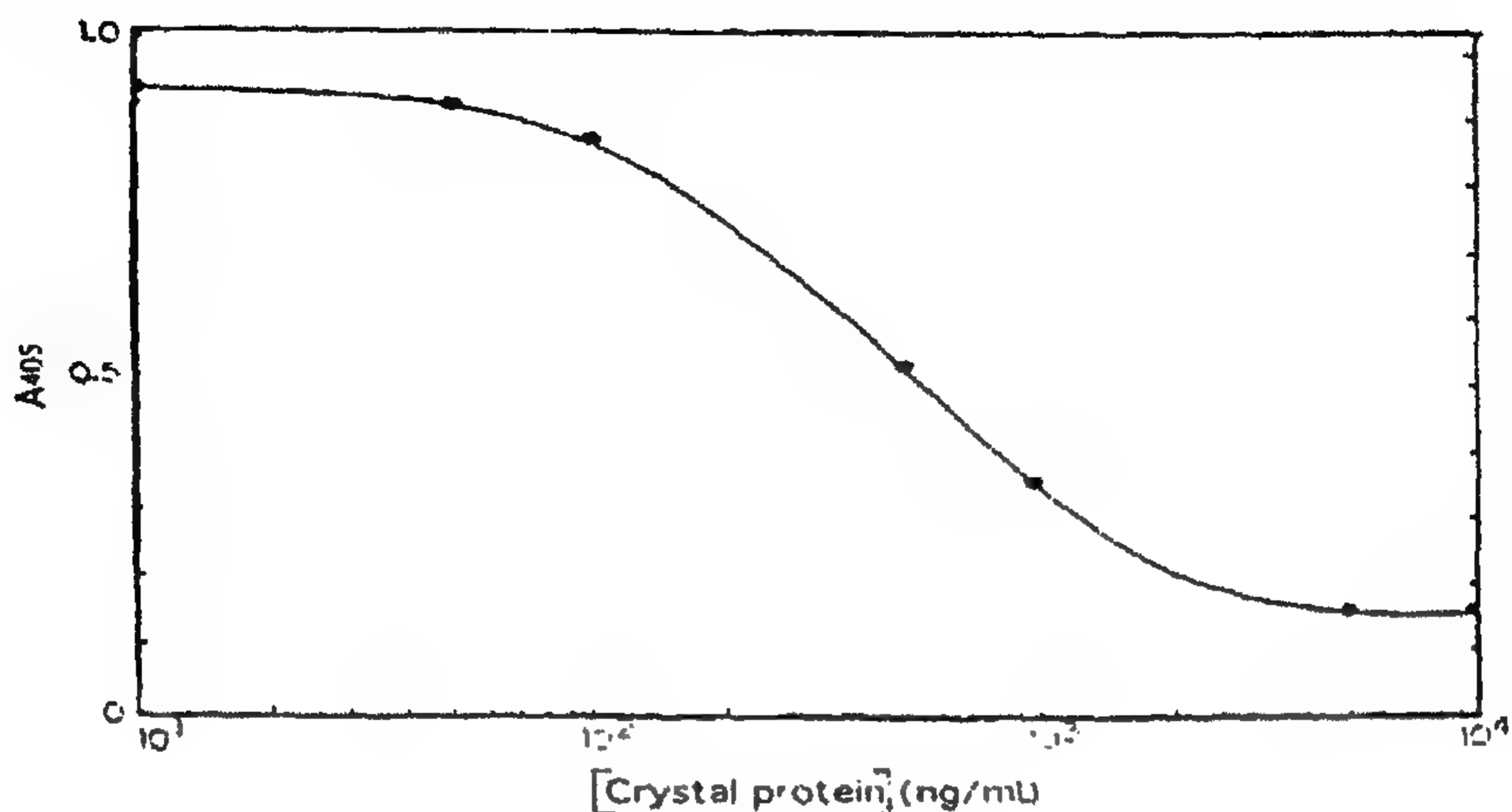
شكل (٤-١٥) : رسم توضيحي لطريقة اليزا الجسم المضاد غير المباشرة.

لقياس تركيز الدلتا-اندوتوكسين: يستخدم الاليزا التثبيطي كما هو موضح في الشكل (٤-١٦). عينات التخمر التي تحلل بهذه الطريقة دائما تعامل مسبقا بالكباس الضاغط الفرنسي عند ٢٠٠٠٠ psi لتحرير كل الدلتا-اندوتوكسين من الخلايا بعد ذلك يتم اذابة العينات بواسطة الصودا الكاوية ٠.٠٢ مولر لمدة ١٦ ساعة على درجة حرارة الغرفة. تخفيفات

العينات و المحاليل القياسية من الدلتا-اندوتوكسين المذابة تَخلط مع تركيز معلوم من الجسم المضاد ويسمح لها بالارتباط. هذه العينات والقياسية تُضاف عندئذ للطبق ذو المجرات الدقيقة كما حدث قبلا. الجسم غير المرتبط المتبقي يجب ان يرتبط بالدلتا-اندوتوكسين المذابة على الطبق. يستكمل بقية الاختبار كما ذكر سابقا. يقاس تركيز الجسم المضاد على الطبق وقد وجد انه يتناسب عكسيا مع تركيز الدلتا-اندوتوكسين في العينات باستخدام بلورات البروتين القياسية للدلتا-اندوتوكسين يمكن عمل منحنيات قياسية كما في الشكل (٤-١٧). لذلك فان تطور اللون يعطي تركيز الدلتا-اندوتوكسين مباشرة.



شكل (٤-١٦) : رسم توضيحي لطريقة الاليزا التثبيطية inhibition ELISA



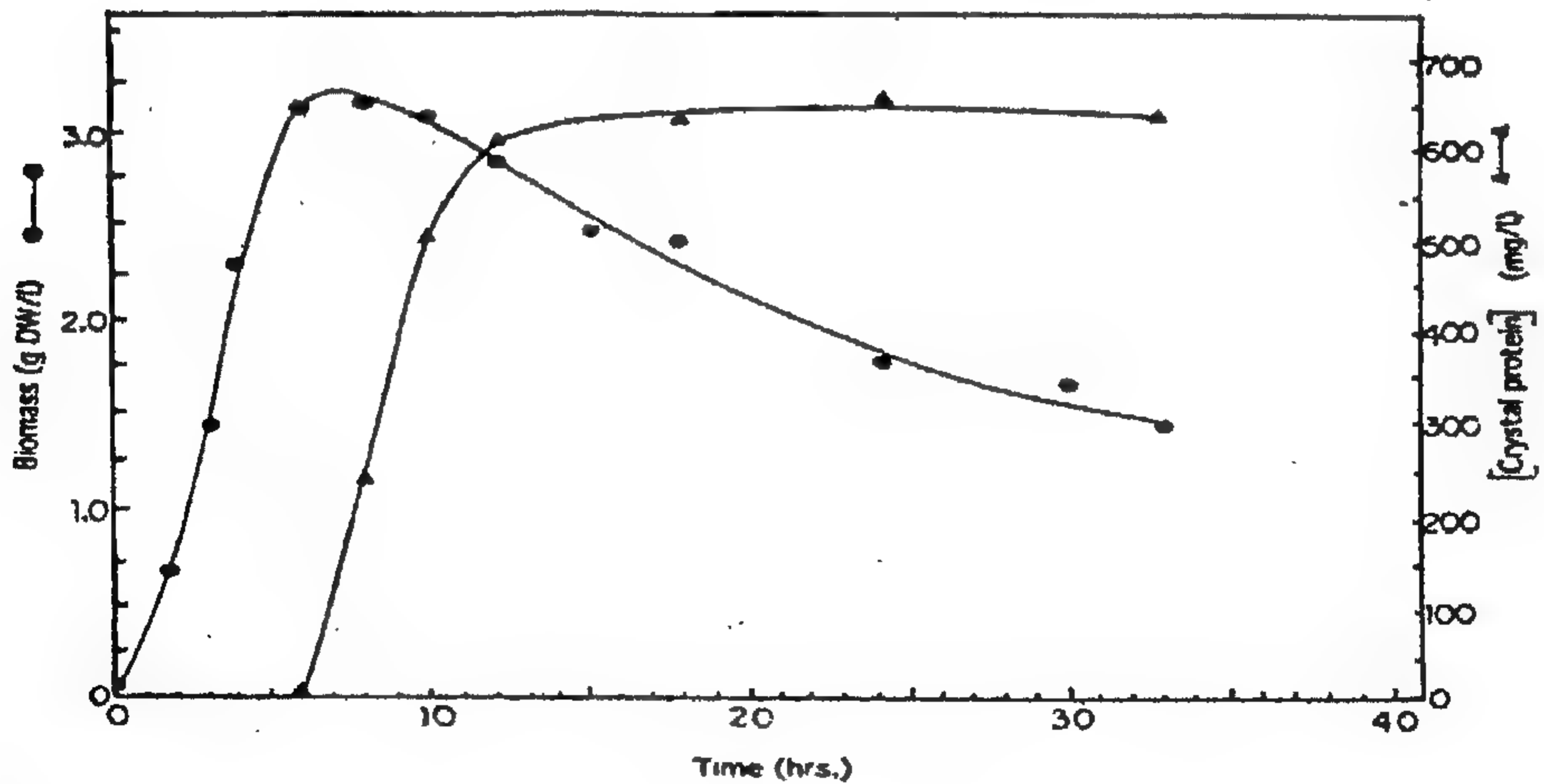
شكل (١٧-٤) : المنحني القياسي للاليزا التثبيطية باستخدام البروتين البلوري النقي الذائب في القلوي . الجزء الخطي من المنحني النصفى لوغاريتمي يعطي مدى الشغل للتقييم الحيوي . في هذه الحالة ٢٠٠-١٢٠٠ نانوجرام / ملليمتر.

قياس الدلتا- اندوتوكسين في تخميرات البكتريا Bt :

كي نستوضح امكانيات ونجاحات استخدام طريقة الاليزا مع الاجسام المضادة عديدة الكلونة لقياس انتاج الدلتا-اندوتوكسين ثم اجراء عدد من التخميرات. النتائج التي تحصل عليها من تخمير واحد لتر للباسبيليس كورستاكي HD-1 لانتاج الدلتا-اندوتوكسين موضحة في الشكل (١٨-٤). اوضحت التجربة تحقيق اقصى كتلة انتاج في ٥-٦ ساعات مع بداية انتاج دلتا-اندوتوكسين بعد ٦ ساعات واستكملت بعد ١٢ ساعة. هذا يحدث قبل التحلل المعنوي للخلية ومعظم الخلايا ماتزال في تلامس في هذا الوقت. يحدث تحلل كامل للخلايا بعد ١٥ ساعة او اكثر. هذا يشير الى حدوث تتابعات مثيرة للانتاج الصناعي ومن الممكن ان يكون التوكسين ثابت. استخدام الجلوكوز عادة يكتمل في ٣ ساعات وترتبط

بساقل مستوي حموضة. هذا يرجع الى انتاج الاحماض العضوية خلال تمثيل الجلوكوز (Rowe ١٩٩٠) كلما تقدم تحلل الخلايا يتجه حموضة البيئة نحو القلوية اكثر.

كان لابد من التأكد من كفاءة و صلاحية ودقة وتكرارية الطريقة لذلك تمت مقارنة كل التجهيزات المحتوية على بكتريا Bt في الدراسات المصرية مع السلالات القياسية الدولية وكذلك البلورات المنقاه للدلتا-اندوتوكسين باستخدام طريقة الاليزا (جدول ٤-٢٨). لقد اظهرت النتائج وجود نشاط للجسم المضاد ضد كل السلالات المصرية NRC B.t. aizawai المختبرة ولكن عند مستويات اقل من السلالات الدولية القياسية B.t. kurstaki HD-1 والتي تم تطوير الاجسام المضادة وحيدة الكلونة. لقد اظهرت السلالة فاعلية شديدة عندما قيست بطريقة الاليزا لقد اعطت تجهيزات البلورات النقية فاعلية اكثر بثلاثة امثال من التجهيز الدولي القياسي. النشاط العبوري المضادة للدلتا-اندوتوكسين لمختلف السلالات Bt لوحظ قبلا Wie واخرون ١٩٨٢.



شكل (٤-١٨): قطفة تخمير الباسيليس تورينجينسيز كورستاكي HD-1 في واحد لتر من مفاعل Belco القلاب. يوضح الرسم الكتلة الحيوية وبلورات بروتين الدلتا-اندوتوكسين.

جدول (٢٨-٤) : تحليل الاليزا للدلتا-اندوتوكسين في عينات Bt باستخدام الجسم

المضاد وحيد الكلونة.

| Sample No. | Sample Origin | Delta-Endotoxin Activity (IU/MG) | Ave. Activity (IU/MG) | Comments |
|-------------|--|----------------------------------|-----------------------|--|
| HD-1-S-1980 | International standard sample B. thuringiensis (B.t.) HD-1, kurstaki | 16.000 | 16.000 | Used as standard |
| HD-134 | NRC Egyptian sample, B.t. aizawai strain | 12.350 12.310 13.310 | 12.657 | |
| HD-282 | NRC Egyptian sample, B.t. aizawai strain | 11.570 11.420 12.050 | 11.680 | |
| HD-133 | Dr. O. Morris B.t. aizawai strain | 36.680 35.290 | 35.985 | Dr. Morris request |
| MB2.6/6 0.1 | Dr. O. Morris New strain not Identified yet. | 13.920 16.180 15.250 | 15.117 | Newstrain of B.T. isolated by Dr. O. Morris, not identified yet, Dr. Morris request. |
| AM-Crystals | Dr. A. Margaritis purified crystals of delta-endotoxin. B.t. HD-1 var kurstaki | 46.110 51.740 47.440 | 48.430 | Purified crystals of delta-endotoxin from B.t. HD-1 var. kurstaki prepared in the lab. Of Dr. A. Margaritis. Used to compare with other B.t. samples from Egypt and O.Morris |

Note : All Elisa analysed were done in triplicate with DE NOVO sample preparation and ANA.

Dr. A, Margaritis/mm, July 12.1991.

REFERENCES

- De st. Groth, S.F. and Scheidegger, D. (1980). *J. Immunol. Methods* 35, 1-121.
- Margaritis, A., Morgan, T. ; Jiang, L. and peterson, N.O. (1991a). Development of a novel optical fiber biosensor to measure delta-endotoxin in *Bacillus thuringiensis* fermentation, (work in progress).
- Margaritis, A., pham, T. ; Nichols, S. ; te Bokkel, D. and strejan, G.H. (1991b). Kinetics of growth of a new hybridoma cell system and production of monoclonal antibodies against the bioinsecticidal protein delta-endotoxin. Presented at Canadian chemical Engineering conference, Oct. 9,1991, Vancouver, B.C. , Canada.
- Kosir, J. (1989). Development of an enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA) for measurement of the bioinsecticide delta-endotoxin in *Bacillus thuringiensis* fermentations, M.E. Sc. Thesis, Univ. Western ontario, london, Ontario000, Canada.
- Rowe, G. (1990). Central metabolism of *Bacillus thuringiensis* during growth and sporulation, ph.D.thesis. univ, western ontario, london, ontario, canada.
- Sharpe, E.S. Nickerson, K.W.; Bulla, L.A. Jr. and Arosnson, J.N. (1975). Separation of spores and parasporal crystals of *bacillus thuringiensis* in gradients of certain X-ray contrasting agents. *Appl. Microbiol.* 30, 1052.
- Wie, S.I. Andrews, R.E.; Hammock, B.D. ; Faust, R.M. and Bulla, L.A. (1982).
- Enzyme-linked immunosorbent assys for detection and quantitation of the entomocidal parasporal crystalline protein of *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki* and *israelensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 43, 891-894.

الباب الخامس

مختارات في الدراسات التي أجريت في المعاهد البحثية والجامعات المصرية
عن فاعلية وأداء سموم وأحداث الفعل في
بكتريا باسيليس ثيرنجيسيز

١ - الاختلافات الوراثية بين بعض أنواع بكتريا باسيليس ثيرنجيسيس للدكتور
السيد صلاح على مصطفى للحصول على درجة الماجستير في العلوم (نبات
/بيولوجية / جزيئية للميكروبات) من كلية العلوم - جامعة المنصورة عام ١٩٩٤.

لقد بدء استخدام أنواع مختلفة من الميكروبات مثل الفطريات والبكتريا والفيروسات
في مكافحة البيولوجية للحشرات الضارة منذ بداية هذا القرن وخصوصا ضد الحشرات
الزراعية والطبية واللتان سببنا فقدا كبيرا في الدخل القومي. ومن أشهر هذه الميكروبات
بعض أنواع البكتريا العضوية المتجرفة (*Bacillus* , *Bacillus sphaericus* , *thuringiensis*) والتي تنتج بروتينات بلورية الشكل أثناء تجرثمها وهذه البروتينات لها
القدرة على قتل الحشرات التابعة لرتبة حرشفيات الأجنحة وثنائيات الأجنحة. لكن بكتريا
Bacillus thuringiensis اكتسبت شهره أكبر لذلك تم استخدامها على نطاق واسع
لمكافحة الكثير من الآفات وخاصة الزراعية منها. وبالرغم من اكتشاف بكتريا (*Bacillus* *thuringiensis*) في بدايات هذا القرن (١٩٠١-١٩١١) إلا أن استخدامها كمبيد حيوي
لمكافحة الحشرات تأخر جدا ؛ حتى تم أعاده اكتشاف قيمته الاقتصادية في الأربعينات
والخمسينات من هذا القرن وصاحب ذلك جدل حول نوعيه هذه البكتريا وكيفية التفريق
بينها لأنواع النوع الأكثر قدره على قتل الحشرات تجاريا.

منذ منتصف الأربعينات وبالتحديد في (١٩٤٦) بدء العمل على التصنيف التقليدي
للعزلات المختلفة من هذه البكتريا كجزء من عائلة البكتريا العضوية وتم وضعها كجنس
مستقل باسم *Bacillus thuringiensis* فقط لقبرتها على إنتاج الأجسام البلورية والقضاء
على الحشرات التابعة للرتب المختلفة ولكن ظل الغموض يحيط بالعزلات المختلفة التابعة
لهذا النوع من البكتريا بالرغم من استخدام العديد من الطرق التقليدية والغير تقليدية لتقسيم
هذه البكتريا الى تحت أنواع عديدة اعتمادا على الاختبارات المناعية لبروتينات الأسواط
المتواجدة على سطح كل نوع واختبارات الكيموحيوية والشكل الخارجي كما تم دراسة

العلاقة بين تركيب الحامض النووي (دنا) والحامض النووي الريبوسومي (رنا ١٦ أس) لدراسة مدى التقارب بين تحت الأنواع المختلفة التابعة لهذه البكتيريا.

كما أنه تم نشر العديد من الدراسات التي استهدفت التفريق بين تحت أنواع هذا الكائن ولكن الإجابات لم تجزم في التفريق بينهما وظل السؤال حتى الآن بدون أجابه كافيه ومازال الخلط بين تحت الأنواع قائم ومستمر لذلك استهدفت هذه الدراسة محاولة التغلب على بعض المشاكل السابقة عديدة تقسيم تحت هذه الأنواع عن طريق دراسة شاملة لاختلافات الوراثة على المستويات المختلفة مثل المحتوى البروتيني للخلايا الخضريه والخلايا المتجرئة والعلاقات السير ولوجيه بين البروتينات السامة ودراسة المحتوى الوراثي باستخدام الأنزيمات المحددة وتفاعلات RAPD.

ولقد تم اختيار عشر عزلات من تحت نوع من هذه البكتيريا جميعها تنتج بلورات بروتينية هرميه الشكل سامه للحشرات الاختبارات لرتبه حرشفيات الأجنحة وهي تحت أنواع kurstaki HD1 alesti - kurstaki - kenyae - berliner - kurstakiHD73 - sotto morrisoni - toumanoffi - tolworthi لدراسة الاختلافات الوراثة بين تلك الكائنات وقد تم استخدام العديد من التقنيات الحديثة والتي اشتملت على الآتي:-

١- مقارنة المحتوى البروتيني للخلايا الخضريه والخلايا المتجرئة بعد فصله كهربيا لكل تحت نوع على أوساط جيلاته كما نشرت بواسطة (Lammile 1970) وقد تم إنماء هذه التحت أنواع على أوساط غذائية مناسبة للنمو الخضري، وأخرى تم تشجيعها على التجزئ ؛ ولقد تم تجميع هذه الخلايا بواسطة جهاز الطرد المركزي ثم فتحت لتحرير المكونات البروتينية للخلايا عديدة وجود مواد مختزله تحفظ البروتينات في حالة مفردة وينتج عن ذلك تحميل كميات متساوية من هذه التحت أنواع على تركيز مناسب من الأوساط الجيلاتينية ثم فصلها باستخدام تيار كهربائي ذو جهد مناسب لفترة محدودة من الوقت ثم بعد ذلك يتم صبغ هذا الوسط الجيلاتيني بصبغات متخصصة البروتينات لإظهار مقدار الاختلاف بين هذه التحت أنواع قيد الدراسة ؛ حيث وجد أن هذه التحت أنواع تختلف عن بعضها في الطرز البروتينية حتى بين التحت أنواع المتقاربة جدا مثل Kurstaki HD73 & urstaki HD1.

٢- النووي الاختلافات بين المحتوى البلازميدي لهذه التحت أنواع العشرة وذلك بتميتها في وسط غذائي غني لمدة ١٤ الى ١٦ ساعة عند ٣٠ درجة مئوية ثم عزل وتنقيه البلازميدات في كل تحت نوع من هذه البكتيريا باستخدام عدد من

الأنزيمات لفتح الخلايا كما هو متبع في طريقه (Bron, 1990) وتم فصل المحتوى البلازميدي تبعا لوزنها الجزئي على أوساط جيلاتينية وتيار كهربائي مناسب وظهرت على هيئة حزم خطية باستخدام صبغه خاصة بعد تعريضها للأشعة فوق بنفسجية وقد وجد أن المحتوى البلازميدي لهذه التحت أنواع غير متماثل.

٣- اختلاف البصمات الوراثية لكل من المحتوى البلازميدي والمحتوى الكروموسومي لكل نوع من تحت هذه الأنواع عند هضمها ببعض أنزيمات القطع المحددة التي تقطع الحمض المناعية (دنا) عديدة أجزاء محددة كما هو مبين في طريقه Gill, et. al. 1985 & et. al. 1987 مما يؤكد الاختلاف والتباين بين تلك التحت أنواع رغم أن هذه الأنواع جميعها تقتل الحشرات من رتبة حرشفيات الأجنحة.

٤- اختبارات التفاعلات المختلفة بين تلك التحت أنواع المتجرثة بالأجسام المضادة المتخصصة ضد هذه البروتينات السامة للحشرات حرشفية الأجنحة وذلك بطريقة الانتشار المزدوج (Bumman, et.al. 1985 & 1988) ولقد أظهرت تلك إنتاج المختلفة لهذه التحت أنواع بعض الاختلافات على الرغم من أن هذه الأنواع جميعها تشترك في ظاهرة قتل الحشرات حرشفية الأجنحة.

٥- استخدام تقنية التفاعل السلسلي البوليمرازي (Carozzi, et. al. 1991) حيث أنه يتم استخدام بادئات صغيره مماثلة لأجزاء محددة من الجينات السامة المعروفة والمنشور تتابع نيوكليوتيداتها لرتبة حرشفيات الأجنحة ويستغرق هذا التفاعل عدة دورات حرارية متابعه تبلغ ٣٥ دوره وتشمل كل دورة تسخين العينة من المادة الوراثية عند درجة حرارة ٩٤°م لمدة ٤٥ ثانية لتحويل جزئ (دنا) الى الحالة المفردة متبوعا بالتبريد عند ٤٥°م لمدة ٤٥ ثانية حتى تلتحم البادئات مع جزئ (دنا) المفرد وتسخينها مرة أخرى عند ٧٢°م لمدة دقيقتين حتى تتم البلمرة وبناء قطع محددة من (دنا) ذات أوزان جزئية مقدرة قبل ذلك وفي حالتنا هذه ظهرت قطعتين من (دنا) الصغرى منها ذات وزن جزئ (٤٩، ٠ ك ق) والكبرى ذات وزن جزئ (٩٠٨، ٠ ك ق) وظهور هاتين الحزمتين يعتبر دليلا مميزا لكل المورثات (الجينات) المنتجة البروتينات السامة لرتبة حرشفيات الأجنحة ولقد وجدت هاتين القطعتين في جميع التحت أنواع حيث أنهم جميعا يحملون هذا الجين السام.

٦- استخدم تقنية التفاعل السلسلي البوليمرازي بطريقة (Willims, et.al. 1990) باستخدام بادئات عشوائية وهذه البادئات العشوائية تختلف عن البادئات المتخصصة

من حيث أنها لا تكون متخصصة عديدة الارتباط مع جين معين ولقد تم هذا التفاعل على عينة كرموسوم (دنا) من كل نوع من هذه التحت أنواع عديدة سلسلة دورات حرارية تبلغ ٤٥ دوره تتضمن تسخين لمدة ٤٥ ثانية عند درجة حرارة ٩٤°م ثم ٣٥°م لمدة دقيقة ثم ٧٢°م لمدة دقيقة ولقد أظهر هذا التفاعل على مستوى (دنا) بين هذه التحت أنواع من وجود تماثل واختلاف بين هذه التحت أنواع.

٧- استخدام تقنية تهجين الأحماض النووية (Feinberg 1989 & Southern, 1975) مع كاشفات ذات تتابع نيوكلييتيدي مماثل للجين المسئول عن السمية عديدة المحتوى الوراثي (البلازميدي) لهذه التحت أنواع والتي لها القدرة على قتل الحشرات حشرية الأجنحة؛ حيث أظهرت الدراسات أن هذا أتلجين محمول على بلازميدات ذات أوزان جزيئية مختلفة وأن موضع هذا الجين على البلازميد في كل تحت نوع مختلف.

٨- استخدمت المعالجات الحرارية لتحديد ما إذا كان الجين المسئول عن السمية متواجد على أحد بلازميدات الخلية أو على الكروموسوم (Ward & Ellar, 1983) وذلك بإنباء هذه الكائنات في أوساط غذائية مناسبة للتجريم وعند درجات مرتفعة (٣٧°م - ٤٢°م - ٤٥°م) وقد لوحظ أن كل التحت أنواع قد فقدت القدرة على تكوين هذه البلورات جزئيا أو كليا عند درجات الحرارة ٤٢°م - ٤٥°م درجة مئوية.

٢ - الخصائص الجزيئية وتعريف مستقبل سم بكتريا باسيلليس ثيرنجينسيس لإحدى آفات الذرة الدودة القارضة (حشرية الأجنحة) للسيد جمال إبراهيم هريدى عثمان للحصول على درجة ماجستير غذائي العلوم - حشرات - مكافحة بيولوجية من كلية العلوم - جامعة القاهرة عام ١٩٩٦ تحت إشراف أ.د. أمينة محمد عبد الرحمن ، أ.د. ممدوح حسن إدريس.

تمثل الإصابة بالآفات الحشرية خسارة اقتصادية كبيرة غذائي كثير من المحاصيل الزراعية لذلك أستخدم المزارعون المبيدات الحشرية لحماية المحاصيل. وظلت المبيدات الكيميائية أثناء العقدين الماضيين ذات تأثير فعال غذائي القضاء على الآفات، لكن الاستخدام المكثف والعشوائي لهذه المبيدات تسبب غذائي الكثير من المشاكل للإنسان والبيئة المحيطة به وذلك من خلال تراكم المبيدات غذائي التربة والماء والهواء والمنتجات الزراعية والحيوانية. فادى ذلك لحدوث خلل بني ظاهري وملوس ومن نتائجه الخطرة:

أولاً: أن قضت المبيدات (حيث أنها غير متخصصة بدرجة عالية) على كثير من الأعداء الطبيعية ذات القدرة على إصابة وقتل الآفات الحشرية الضارة مما زاد من انتشارها وتكاثرها بأعداد كبيرة.

ثانياً: الخطر الثانى الناجم عن هذه الاستخدامات العشوائية للمبيدات هو ظهور سلالات جديدة من الآفات الزراعية لا تتأثر بالمبيدات الحالية ومقاومة لها مما يؤدي الى مضاعفة الخسائر الاقتصادية متمثلة غذائي التكلفة الإنتاجية العالية. ولذلك قامت شركات المبيدات بتصنيع أنواع جديدة من المبيدات ذات درجة سمية عالية وأشد فعالية غذائي مكافحة الحشرات ولكن ظهر أن الأنواع الجديدة من المبيدات تسبب أضراراً أكثر للإنسان والبيئة والصحة العامة.

كان شغل العلماء شاغل هو البحث عن البديل. فشهد مطلع هذا القرن (١٩٠٢) اكتشاف العالم أشتاوتا لنوعاً من البكتيريا العصوية المتجرثمّة قادرة على قتل يرقات دودة الحرير. وبعد تقريباً خمسة عشر عاماً تمكن عالم آخر بمحافظة ثيرنج بألمانيا من اكتشاف نوع جديد من هذه البكتيريا أطلق عليه (باسيلليس ثيرنجينسيس) ثم توالى الاكتشافات والأبحاث حتى أصبحت الآن ٤٥ تحت نوع (برافو ١٩٩٧). تنتج هذه البكتيريا بروتين سام للحشرات على هيئة بلورات أثناء تجرثمها (وسيلة للمحافظة على النوع تحت الظروف البيئية الغير مناسبة). هذه البروتينات البلورية لمركزي لدرجة عالية حيث أثبتت

الأبحاث غذائي جميع أنحاء العالم أنها غير ضارة بأى من الكائنات الحية. وتنقسم هذه البروتينات البلورية حسب تأثيرها على الحشرات الى ٦ أقسام رئيسية:

- | | |
|--------------|---|
| القسم الأول | : يقتل الحشرات حرشفية الأجنحة فقط. |
| القسم الثانى | : يقتل الحشرات ثنائية الأجنحة وحرشفية الأجنحة |
| القسم الثالث | : يقتل الحشرات غمدية الأجنحة |
| القسم الرابع | : يقتل الحشرات ثنائية الأجنحة |
| القسم الخامس | : يقتل الحشرات غمدية الأجنحة وحرشفية الأجنحة |
| القسم السادس | : يقتل النيماتودا |

لقد تم اكتشاف نوع آخر من البروتينات السابقة ينتج بواسطة هذه البكتيريا غذائي مرحلة التكاثر الخضري له القدرة على التأثير على بعض الحشرات من حرشفية الأجنحة. ومن الجدير بالذكر أن المبيدات الحيوية التى تصنع من بكتيريا باسيليس ثيرنجينسيس تشكل تقريبا ٩٠ - ٩٥% من مجموع المبيعات العالمية من المبيدات الحيوية. أعطى اكتشاف هذه البكتيريا دفعة قوية لنظرية مكافحة البيولوجية للآفات وبعبارة جديدة اعتمد على تصنيع مساحيق من هذه البكتيريا العضوية بواسطة تقنيات التكنولوجيا الحيوية والمخمرات ويتم رش النباتات والمحاصيل المختلفة بهذه البكتيريا لحمايتها من الإصابة بالحشرات الضارة. ظهرت بعض المشاكل التى تحد من استخدام البكتيريا كمبيد حيوي منها أن البروتينات البلورية السابقة المختلفة بواسطة هذه البكتيريا تتكسر وتفقد سميتها بتعرضها لفترات طويلة لضوء الشمس بواسطة الأشعة فوق بنفسجية كما أن رشها على السطح العلوي يعرضها للغسل بواسطة قطرات الندى والأمطار كما أن معظم الحشرات تتغذى على السطح السفلي للأوراق مما فتح الباب أمام البيولوجيا الجزيئية والهندسة الوراثية غذائي نظرية تطوير مكافحة البيولوجية حيث أمكن كلون الجين المسئول عن هذا البروتين السام غذائي بكتيريا أشرشيا كولاي ودراسة التتابع النيوكلوتيدي لهذا الجين كمرحلة وسيطة ثم بعد ذلك دراسة إمكانية التغيير غذائي التركيب النيوكلوتيدي لهذا الجين ليكون مناسباً لنقله إلى النبات وبالفعل تم إنتاج نباتات محورة وراثياً تحمل هذا الجين لها القدرة على اعتماداً هذا البروتين كمرحلة وسيطة ثم بعد ذلك دراسة إمكانية التغيير غذائي التركيب النيوكلوتيدي لهذا الجين له القدرة على إنتاج هذا البروتين السام بدرجة تجعلها تقاوم الحشرات ومن مميزات هذه النباتات المحورة وراثياً أن لها القدرة على توريث الجين من جيل إلى آخر وبهذا يمكن التقليل أو عدم استخدام الرش المباشر بهذا المبيد الحيوي.

- استهدفت هذه الدراسة عزل وتعريف وتنقية وكلونة أحد الجينات من بكتريا باسيلس ثيرنجينس لها القدرة على قتل الدودة القارضة كما استهدفت أيضا تعريف وتنقية وكلونة الجين المستقبل غذائي المعى الأوسط لهذه الحشرة ويمكن تلخيص النتائج كما يلي:-
- ♦ أن العزلة المحلية BtaC18 تحتوى على 15 cry سام بالإضافة الى سم Exg-t وأثبتت هذه العزلة قتلها للعديد من الآفات الزراعية غذائي رتبات محدودة.
- ♦ تم تنقية البروتين عن طريق كبريتات الأمونيوم 40% ثم بعد ذلك مرورها على جهاز ال HPLC .
- ♦ تم اختيار هذا البروتين ضد الدودة القارضة وأعطى نتائج مؤثرة وكانت نسبة ال 50 % تساوى 14 نانو جرام لكل سنتيمتر تربيع.
- ♦ تم نقل هذا البروتين المنقى الى غشاء بروتيني وتم عمل تتابع للأحماض الأمينية وبناء عليه تم عمل بادئات لمركزي لهذا الجين السام وتم عمل كلونه لهذا الجين.
- ♦ تم عمل تتابع نيكلوتيدي لكل الجين وأوضحت النتائج أن طول ال Coding region 2300 نيوكلوتيده تقريبا 789 حمض أميني وتبين من النتائج أن هذا الجين أعطى نسبة تشابه مع ال (Vip) جين بنسبة 97%.
- ♦ تم نقل هذا الجين الى Expression vector وتم اعتمادا هذا البروتين غذائي بكتيريا اشرشيا كولاي بكفاءة عالية.
- ♦ تم تحديد المستقبل Receptor بروتين لهذا الجين بواسطة تجربة ligand biot هي عبارة عن تعليم هذا البروتين بذرة يود مشع 125 وقد وجد أن هذا البروتين يرتبط مع مستقبل بروتين غذائي الخملات المبطنة للمعى المتوسط لحشرة الدودة القارضة وهذا المستقبل البروتيني له وزن جزيئي 48 كيلو دالتون.

انتقية الجين المستقبل Receptor gene

- ♣ تم عمل تجربة immunopenricitation وعمل تتابع للحامض الأميني وتم تصميم بادئ للحصول على الجين الخاص بالمستقبل. وتم كلونة الجين وعمل تتابع نيوكلوتيدي لكل جين وتبين من النتائج أن الجين يتكون من 1370 نيوكلوتيده 413 حمض أميني كما تم عمل تشابه لهذا الجين مع الجينات الأخرى وتبين أن نسبة التشابه 93% مع أسرة ال (Vip) على مستوى ال DNA.

❖ تم نقل هذا الجين الى Experssion vector وتم اعتمادا البروتين غذائي أشيرشيا كولاى بكفاءة عالية مما سبق تتضح القدرة الفائقة للعزلة المحلية كما يوصى بإنتاج هذا الجين من هذه العزلة لإنتاج نباتات محوره وراثيا تستطيع مكافحة الآفات الزراعية الاختبارات لرتبة حرشفية الأجنحة لحماية البيئة من التلوث الكيميائي الناجم عن استخدام المبيدات الحشرية غذائي الزراعة.

❖ كما أن تعريف وتحديد الجين المستقبل Receptor الخاص بالدودة القارضة سيساعد كثيرا غذائي معرفة المستقبل receptor الخاص بالدودة القارضة وهذا سيساعد كثيرا غذائي معرفة طرق مقاومة الحشرات للمبيدات غذائي المستقبل.

٣- تطور وتوصيف المقاومة لبعض المبيدات الحيوية غذائي فراشة دودة ورق القطن سبودوبتراليتوراليس" للسيد/ أحمد محمد أحمد محمد للحصول على درجة الماجستير غذائي العلوم (علم الحشرات) تحت إشراف أ.د. محمد سعد حامد ، أ.د. محمد سيد سلامة ، د. وليد محمد زكي الياسقى عام ١٩٩٧.

استهدفت الدراسة التي تحديد إمكانية اكتساب المقاومة غذائي يرقات دودة ورق القطن لبكتيريا باسيلس_ ثيرانجينسيس. استخدمت أربعة عزلات من البكتيريا غذائي هذه الدراسة هما (باسيلس ثيرانجينسيس اينتوموسيداس ، باسيلس ثيرانجينسيس فينتيماس) والآخرين عزلات جديدة مصرية برمز دى أى ٢٩ ، س ١٢ وقد اشتملت الدراسة على توصيف خواص العزلات المستخدمة من خلال الفصل الكهربائي لبروتينات الخلايا الخضارية والجرثومية وتعيين السمية لكل منهم ضد يرقات دودة ورق القطن. استخدمت العازلتين اينتوموسيداس ، دى أى ٢٩ غذائي دراسة تطور المقاومة غذائي دودة ورق القطن وذلك بتعرض اليرقات لتركيزات منخفضة لمدة ٨ أجيال متتالية ودراسة طرق المقاومة متبادلة بين هذين النوعين مع دراسة طرق توارث المقاومة لعزلة (اينتوموسيداس) غذائي يرقات دودة ورق القطن كما تم دراسة تأثير هذه التركيزات المنخفضة على بعض الأنشطة البيولوجية للحشرة أثناء عملية الانتخاب للمقاومة. اشتملت على عمر الطور اليرقي والنسبة المئوية للتغذية ونسبة الذكور للإناث وعمر الطور العذري والنسبة المئوية لخروج الطور الكامل ودرجة الخصوبة للإناث وإنتاجية البيض والنسبة المئوية للفقس وتم أيضا دراسة تشريحية مقارنة للمبيض في السلالة المنتخبة وكذلك دراسة هستوباثولوجية للمناسل العادية والناجمة من المعاملة المتكررة. استهدفت الدراسة توصيف وتقييم بعض العزلات الحقلية من الباسيلليس ودراسة تطور وخواص المقاومة للعزلات فى دودة ورق القطن سبودوبترا ليتوراليس" . استخدمت عزلتان من البيئة المصرية تحت دليل اصطلاحي دى أى ٢٩ ، سى ١٢ وتربيتها على وسط ت ٣ وقد استخدمت طريقة الفصل الكهربائي للبروتين لدراسة مقارنة بين الأنواع الأربعة من الباسيلليس وقد اشتملت الدراسة على النقاط الآتية:

١- دراسة حساسية دودة ورق القطن للمبيدات البكتيرية: استخدمت طريقة المعاملة بالتغذية لتعيين حساسية يرقات دودة ورق القطن للمبيدات البكتيرية وذلك بخلطها بالوسط الغذائي الصناعي لدودة ورق القطن والذي يتكون من خليط مسحوق الفاصوليا الجافة (١٥٠جم) والخميرة الجافة (١٥جم) وحمض الأسكوربيك (٣)

(جم) ومادة النيباجين (٣جم) وأجار أجار (٦جم) مذابة في ٦٠٠ مل ماء مقطر وذلك بتعريضها لسلسلة من التركيزات.

٢- دراسة المقاومة لمبيد بكتيري: تم دراسة المقاومة للمبيد البكتيري دى أى ٢٩ ، مع النوع المعروف باسيليس ثيرانجينسيس أينتوموسيداس وذلك بالانتخاب لعدة أجيال بتركيزات تكفى لقتل ٧٥% من اليرقات المعرضة للحصول على سلالات مقاومة للبكتيريا.

أ - عبور المقاومة: استهدفت الدراسة فى العشائر المنتخبة دراسة عبور صفة المقاومة المكتسبة للسلالتين المقاومتين للبكتيريا دى أى ٢٩ ، باسيليس ثيرانجينسيس أينتوموسيداس وذلك بتقدير مستوى المقاومة للمبيد الأول فى السلالة الثانية والعكس بالعكس.

ب - وراثة صفة المقاومة فى دودة ورق القطن: كما استهدفت دراسة توارث صفة المقاومة لأحدهما فى دودة ورق القطن وذلك باستخدام التزاوج بين الأفراد المقاومة والعادية.

ج - دراسة تأثير الانتخاب على بعض الأنشطة البيولوجية لحشرة دودة ورق القطن: استهدفت الدراسة تأثير المعاملة المتكررة أثناء عملية الانتخاب على بعض الأنشطة البيولوجية والتي اشتملت على الخصوبة وفترات النمو اليرقي والعذري والفقس والنسب الجنسية ونسبة خروج الفراش.

د - دراسة هيستوباثولوجية: تم دراسة تأثير المعاملة المتكررة أثناء عملية الانتخاب المتكررة على أنسجة مبايض أنثى فراشة دودة ورق القطن وذلك باستخدام الدراسة التشريحية الدقيقة و الهيستوباثولوجية.

اشتملت الدراسة على النتائج الآتية:

١- توصيف عزلات البكتيريا: تم توصيف عزلات البكتيريا من خلال الفصل الكهربائي لبروتينات الخلايا الخضرية والجرثومية لهذه العزلات وقد وجد بعض الاختلافات فى الحزم البروتينية للخلايا الخضرية فى العزلات البكتيرية. وقد ظهر من خلال الفصل الكهربائي للخلايا الجرثومية وجود حزمة بروتينية عند مستوى ١٣٠ كيلو دالتون وهى تمثل الكريستال (السم المستخدم فى أماته الحشرة).

٢- حساسية دودة ورق القطن لل عزلات البكتيرية: أوضحت نتائج الدراسة المقارنة لنسبة الوفيات عند مستوى ٥٠% وذلك بخلط العزلات (الخلايا الجرثومية مع الكرسيتالات) مع الوسط الغذائي للحشرات على تباين تأثير أنواع البكتيريا وأنه يمكن ترتيب العزلات ترتيباً تنازلياً بالنسبة لفاعليتها كما يأتي:

دى أى ٢٩ < أينتوموسيداس < فينتيماس < س ١٢

٣- الانتخاب يرقات فى دودة ورق القطن دى أى ٢٩، باسيليس ثيرانجينسيس أينتوموسيداس: أثبتت نتائج انتخاب يرقات دودة ورق القطن المقاومة لكل من العزلتين باسيليس ثيرانجينسيس أينتوموسيداس ، دى أى ٢٩ وذلك بتربية الحشرة على تركيزات تحت مميتة تعطى ٧٥% وفاء لمدة ٨ أجيال متتالية. وقد وجد انخفاض تدريجي فى مستوى حساسية اليرقات للبكتيريا المستخدمة للأجيال الثالث والسادس والثامن عنها فى الحشرات العادية غير المعاملة. بالنسبة للسلالة التى تم انتخابها للمقاومة بالعزلة دى أى ٢٩ وجد أن التركيزات المسببة للوفيات عند مستوى ٥٠% للأجيال الثالث والسادس والثامن تمثل ٢، ٣ و ١، ٥ و ٨، ٥ - ضعف التركيز اللازم لقتل الحشرات العادية غير المعاملة. أما بالنسبة للسلالة التى تم انتخابها للمقاومة بالعزلة أينتوموسيداس وجد أن التركيزات المسببة للوفيات عند مستوى ٥٠% للأجيال الثالث والسادس والثامن تمثل ٨، ٢ و ٩، ٢ و ٤، ٣ - ضعف التركيز اللازم لقتل الحشرات العادية غير المعاملة.

٤- المقاومة المتبادلة: أظهرت دراسة المقاومة المتبادلة فى كل من السلالتين المنتخبتين للمقاومة للمبيد البكتيري أن: السلالة المنتخبة للمقاومة بالعزلة دى أى ٢٩ أعطت مقاومة للعزلة أينتوموسيداس بمستوى ٧، ١٤ - ضعف التركيز اللازم لقتل الحشرات العادية غير المنتخبة عند مستوى ٥٠%. بينما وجد أن السلالة المنتخبة للعزلة أينتوموسيداس فقد أعطت مقاومة للعزلة دى أى ٢٩ بمستوى ٢، ٢ مرة فقط.

٥- توارث صفة المقاومة لعزلة أينتوموسيداس فى يرقات دودة ورق القطن: أثبتت دراسة حساسية الجيل الأول الناتج من التزاوج المتبادل لأنثى طبيعية مع ذكر منتخب ضد عزلة دى أى ٢٩ والعكس بالعكس وجد أن قد أنتج هجيناً به صفة المقاومة لعزلة/ أينتوموسيداس صفة سائدة جزئياً وقد انتقلت بواسطة الجنسين أى ليس هناك ارتباط بينها وبين الأجناس وأنها محملة على كروموسومات جسمية

ويلزم لهذه الدراسة دراسة تكميلية لتحديد أعداد الجينات المسئولة عن توارث صفة المقاومة في يرقات دودة ورق القطن.

٦- تأثير المعاملات المتكررة بالعزلات البكتيرية أثناء الانتخاب على بعض الأنشطة البيولوجية لدودة ورق القطن: دلت النتائج على ازدياد ملحوظ في طول العمر السرى وذلك في جميع الأجيال التي تم انتخابها في كل من السلالتين المنتخبتين. انخفاض النسبة المئوية للتعدر بدرجة كبيرة في كل من السلالتين المنتخبتين عنها في السلالة العادية. لم تؤثر المعاملة المتكررة على نسبة الذكور إلى الإناث في كل من السلالتين المنتخبتين بالنسبة للسلالة العادية. لم يتأثر طول العمر العذرى بالمعاملات البكتيرية أثناء فترة الانتخاب للمقاومة. لم يتأثر أيضا نسبة خروج الفراش بالمعاملات البكتيرية أثناء فترة الانتخاب للمقاومة. انخفاض شديد في خصوبة الحشرات في كل من السلالتين المنتخبتين. انخفاض معنوي لمستوى الإنتاجية للبيض إلا أن من البيض الناتج قد أثبت خلال التحليل الإحصائي لم يظهر له فرق معنوي بين السلالتين المنتخبتين والسلالة التي لم يتم انتخابها للمقاومة في نسبة الفقس. التأثير الهيستوباثولوجي نتيجة الانتخاب للمقاومة على الجهاز التناسلي للإناث. أظهرت الدراسة التأثير الهيستوباثولوجي للعزلات باسيليس ثيرانجينسيس أينتوموسيداس ، دى إى ٢٩ فى وجود فراغات فى كل من الخلايا المبيضية والخلايا المغذية، ووجود فجوات ونقص كبير فى المخ نتيجة انكماشه وإعادة امتصاصه وفقدان الخلايا المبيضية لشكلها المستقل.

٤- "التأثيرات المبيدية والفسولوجية لبعض السموم الطبيعية" للطالبة/ سمية السيد على السيد للحصول على درجة دكتور فلسفة فى العلوم الزراعية تحت إشراف أ.د. معدوح حسن إدريس أ.د. نجلاء أحمد عبد الله ، د. محمد سيد سلامة عام ١٩٩٧ من كلية الزراعة - جامعة الأسكندرية

تناولت هذه الدراسة تأثير بعض السموم البروتينية من أصل نباتي (سم بكتريا *Bacillus thuringiensis*) وكذلك بعض السموم الحيوانية (سموم العقرب المتخصصة ضد الحشرات *Lqhit 2 & Aait*) وذلك ضد بعض حشرات حرشفية الأجنحة. هذا وقد استخدمت طرق التقنية الحيوية فى تخليق الجينات الخاصة بسموم العقرب وتم إدخالها الى الفيروس المعروف باسم *Baculovirus* حيث تم إنتاج فيروس مهندس وراثيا يحوى الجين الخاص بإنتاج بروتين سم العقرب المضاد للحشرات ومن ثم تم اختبار التأثير المميت لفيروس الباكولوفيرس بالمقارنة مع الفيروس المهندس وراثيا لمعرفة مدى نجاح المنتج ومعنوية التأثير. وقد تم دراسة تأثير مبيد بيريثرويدي بغرض المقارنة بين طرق مكافحة الحيوية للحشرات والتي تعتمد على استخدام ممرضات الحشرات التقليدية (بكتريا وفيروس) والغير تقليدية (فيروسات مهندسة وراثيا) وتلك الطرق الكيميائية.

وفيما يلى تفصيل أوضح لهذه الموضوعات الموجزة:

أولا : تأثير السموم الطبيعية ذات الأصل النباتي على حشرة من حرشفية الأجنحة

تم دراسة ست سلالات من البكتريا الممرضة *Bacillus thuringiensis* وهى:

(1) Kurstaki HD-1 (4) aizawai TMM3-32

(2) aizawai (5) sotto kMk1-36

(3) wuhanensis (6) indiana

اختبرت هذه السلالات عن طريق جرعات (١٠٠، ٨٠، ٦٠، ٤٠، ٢٠ ميكروجرام/ لكل يرقة) وذلك عن طريق خلطها بالبيئة النصف صناعية والتي اختبرت على يرقات العمر الثالث لدودة اللوز الأمريكية *Heliothis zea* وقد ثبت من النتائج المتحصل عليها أن السلالات من رقم ١ حتى رقم ٤ كانت ذات فاعلية عالية على يرقات العمر الثالث لدودة اللوز الأمريكية. حيث كانت الجرعة المميتة ل ٥٠% عند استخدام السلالات الأربع الأولى ٤٩، ٦٠، ٣٠، ٤٣ ميكروجرام لكل يرقة على التوالي بينما كانت أكثر من ١٠٠

ميكروجرام لليرقة في حالة السلالتين ٥ و ٦. كذلك تم اختبار الجرعات حول الجرعة المميتة ل ٥٠% ضد كل من العمر اليرقي الثاني والرابع للسلالات السابق ذكرها وكان لها نفس التأثير. تم دراسة التراكيب النسيجية بالمجهر الإلكتروني لخلايا القناة الهضمية الوسطى لليرقات المعاملة بغرض توضيح التأثير المرض لهذه البكتيريا حيث تبين ما يلي: انسداد الخلايا الطلائية المبطن للقناة الهضمية الوسطى وانتفاخها واختفاء الأهداب وظهور بعض البقع داخل الخلايا وكذلك تحطم هذه الخلايا وكانت التأثيرات الهستولوجية للسلالات المختلفة المستخدمة مواكبة لتأثيراتها المميتة على الحشرات.

ثانياً : تأثير السموم الطبيعية من أصل حيواني على حشرة من حرشفيات الأجنحة

من المعروف أن الفيروس *Baculovirus* من الفيروسات المتخصصة على الحشرات ويعطى تأثيراً مميتاً وأن كان بطيئاً نسبياً حيث تم اختبار هذا الفيروس ضد ديدان الحرير التوتية *Bombyx mori* في عمرها اليرقي الرابع والخامس عن طريق الحقن حيث تم تقدير الفترة اللازمة لموت ٥٠% من الحشرات فكانت ١١٨,٨ ساعة ليرقات العمر الرابع و ١٢١,٤ ساعة ليرقات العمر الخامس. عن طريق استخدام طرق التقنية الحيوية الحديثة يمكن زيادة كفاءة هذا الفيروس. فمن المعروف أن هناك بعض البروتينات المميتة للحشرات والموجودة في سم العقرب من النوع *Leiurus* *quinquestriatus hector* والنوع *Androctonus australis* والتي تؤثر في المقام الأول على قنوات الصوديوم في الجهاز العصبي للحشرات. وقد تم تخليق الجين الخاص بسم العقرب *Lqhit2* والمكون من ١٨٣ نيكولتيده كذلك تم دراسة تأثير تطويل السلسلة النيكولتيدي لهذا السم حيث أنتج جين يحتوي على ١٩٢ نيكولتيده (*Lghit 2M1*) وآخر يحتوي على ١٨٦ نيكولتيده (*Lghit 2M2*) كذلك خلق الجين الخاص بالسم العقربي المعروف باسم *Aalt* وهذا الجين يحتوي على ٢١٠ نيكولتيده. أيضاً تم إنتاج طفرتين لهذا الجين حيث حل الحامض الأميني أيزوليوسين محل الحامض الأميني ليسين رقم (٥٢) وسمى *Aait 18* وتم إحلال الحامض الأميني تيروزين محل الحامض الأميني سيستئين (رقم ٦٤) وسمى *Aait 19*. وقد أظهرت النتائج أن فيروسات الباكولوفيروس المهندسة وراثياً والمحتوية على الجينات *Lghit 2*, *Lqhit 2M1*, *Lqhit 2M2* قد أدت إلى إسراع موت يرقات ديدان الحرير في عمرها الرابع وكانت الفترة اللازمة لموت ٥٠% من الحشرات على النحو التالي ٧٦,٠٥ ساعة. ٧٢,٢ ساعة. ٧١,٣ ساعة على التوالي

بينما كانت ٧، ١١٨ ساعة في حالة الباكولوفيروس الغير مهندس وراثيا وقد أثبت التحليل الإحصائي معنوية هذه النتائج.

أما عن الفيروس المهندس وراثيا والمحتوى على الجينات Aait, Aait 18, Aait 19 فكانت الفترة اللازمة لموت ٥٠% من حشرات ديدان الحرير عمر رابع هي ٥، ٩٣ ساعة. ٥٧، ٩٢ ساعة. ١٥، ٩٣ ساعة. على التوالي. هذا وقد أثبت التحليل الإحصائي عدم وجود فروق معنوية بين إضافة الجين الأصلي Aait وبين إضافة الجينات المطفرة Aait 19, Aait 18 ولكن هناك فروق معنوية بين إضافة هذه الجينات إلى الفيروس وبين تأثير الفيروس الغير مهندس وراثيا.

ثالثا: تأثير مبيد بيريثرويدي على يرقات ديدان اللوز الأمريكية: تم اختبار سمية المبيد البيريثرويدي fenvalerate على يرقات العمر الثالث لديدان اللوز الأمريكية Heliothis zea وكانت الجرعة المميتة ل ٥٠% من مجموع الحشرات ٠،٠٠١٧، ميكروجرام لكل يرقة.

وأن كانت نتائج المبيدات الكيميائية أسرع تأثيرا إلا أن استخدام عناصر مكافحة الميكروبية للحشرات بصورتها التقليدية وتلك المهندسة وراثيا كانت فعالة وأكثر أمانا للبيئة وصحة الإنسان ويمكن استخدامها في برامج مكافحة المتكاملة Integrated Pest Management بنجاح. وهندسة الميكروبات وراثيا يفتح مجالا أوسع في استخدامها في مجال مكافحة الحشرات وأيضا يتيح الفرصة لاستعمال سموم بروتينية أخرى في هذا المجال.

٥- "كلونة وتوصيف جزيلى لجين جديد مسئول عن مقاومة الحشرات من عزلة معدية من بكتريا باسيلليس ثيرنجينسيس" للسيد/ صلاح على مصطفى للحصول على درجة الدكتوراه فى العلوم (نبات - ميكروبيولوجى) تحت إشراف أ.د. زينب كامل محمد ، أ.د. مجدى أحمد مذكور ، د. محمد سامى الأبيض عام ١٩٩٩.

بلايين الدولارات تفقد كل عام نتيجة تعرض المحاصيل الزراعية والغابات للإصابة بالآفات الحشرية وأيضاً تعرض الإنسان للإصابة بالأمراض بواسطة الحشرات الناقلة للميكروبات. من المعروف أن مصادر الغذاء فى العالم تعتمد على وجود وسيلة فعالة لحماية المحاصيل والحيوان والإنسان من الإصابة بالآفات الضارة. لقد كانت المبيدات الكيماوية أثناء العقدين الماضيين ذو تأثير فاعل فى القضاء على الآفات مما جذب الانتباه الى استخدامها فى برامج مكافحة للآفات ولكن الاستخدام غير المدروس لهذه المبيدات أدى إلى تلوث البيئة من خلال تراكمها فى التربة والماء والهواء والمنتجات الزراعية والحيوانية وهناك سبب آخر وهو تطور المقاومة الطبيعية فى الحشرات لهذه المبيدات ما تسبب فى عدم فاعلية هذه المبيدات الكيماوية فى القضاء على هذا النوع من الحشرات المقاوم للمبيدات الكيماوية وأيضاً قتل الكثير من الأعداء الطبيعية مما أدى إلى حدوث خلل فى التوازن الحيوي. لقد ثبت أن استخدام المبيدات الحيوية البكتيرية والفيروسية والفطرية هى الطريقة الآمنة لتجنب تلوث البيئة الناتج عن استخدام المبيدات الكيماوية. ومنذ أكثر من أربعين عام وبكتريا الباسيلليس ثيرنجينسيس تستخدم كمبيد حيوي لمقاومة الآفات كبديل مناسب ومقبول لحماية البيئة من التلوث بالمبيدات الكيماوية.

مع مطلع هذا القرن اكتشف العالم أشيوتا (١٩٠١) نوع من البكتريا العصوية المتجرئة لها القدرة على قتل يرقات دودة الحرير فى اليابان وبعد مرور حوالي ١٥ عام تمكن عالم آخرى فى محافظة (ثيرنج) بألمانيا من اكتشاف نوع آخر من هذه البكتريا ومنذ هذا التاريخ (١٩١٥) أطلق على هذا النوع من البكتريا اسم (باسيلليس ثيرنجينسيس) ثم توالت الأبحاث لاكتشاف تحت أنواع أخرى حتى أصبحت الآن حوالي ٤٥ تحت نوع (Bravo, 1997). تتج هذه البكتريا بروتين سام للحشرات على هيئة بلورات أثناء تجرئها له درجة عالية من التخصص حيث أثبتت الدراسات التى جرت عليها أنه لا يوجد لها تأثير على أى من الكائنات الحية الأخرى عدا أعدائها من الحشرات.

تقسم هذه البروتينات البلورية حسب تأثيرها على الحشرات الى حوالي ٦ أقسام رئيسية القسم الأول يقتل الحشرات الحشرية الأجنحة فقط والقسم الثانى يقتل الحشرات

ثنائية الأجنحة وحرشفية الأجنحة القسم الثالث يقتل الحشرات غمدية الأجنحة، والقسم الرابع يقتل الحشرات ثنائية الأجنحة، والقسم الخامس يقتل الحشرات غمدية الأجنحة وحرشفية الأجنحة أما القسم السادس يقتل النيماتودا، ولقد أكتشف نوع آخر من البروتينات السامة ينتج بواسطة هذه البكتريا في مرحلة التكاثر الخضري له القدرة على التأثير على بعض الحشرات من حرشفية الأجنحة، المبيدات الحيوية التي تصنع من بكتريا باسيليس ثيرنجينسيس تشكل حوالي من ٩٠% الى ٩٥% من مجموع المبيعات العالمية من المبيدات الحيوية.

هناك بعض المشاكل التي تحد من استخدام هذه البكتريا كمبيد حيوي منها أن البروتينات البلورية السامة المنتجة بواسطة هذه البكتريا تتكسر وتفقد سميتها بتعرضها لفترات طويلة لضوء الشمس بواسطة الأشعة فوق البنفسجية كما أن رشها على السطح العلوي يعرضها للغسيل بواسطة قطرات الندى والأمطار كما أن معظم الحشرات تتغذى على السطح السفلي للأوراق. فكان الحل البديل هو استخدام تقنيات البيولوجيا الجزيئية والهندسة الوراثية حيث أمكن كلونة الجين المسئول عن إنتاج هذا البروتين السام في بكتريا اشريشيا كولاي ودراسة التتابع النيكلوتيدى لهذا الجين كمرحلة وسيطة ثم بعد ذلك دراسة إمكانية التغير في التركيب النيكلوتيدى لهذه الجين ليكون مناسباً لنقله الى النبات. وبالفعل تم إنتاج نباتات محوره وراثيا تحمل هذه الجين لها القدرة على إنتاج هذا البروتين السام بدرجة تمكنها من مقاومة الحشرات ومن مميزات هذه النباتات المحورة وراثيا أن لها القدرة على توريث الجين من جيل إلى آخر وبهذا يمكن التقليل أو عدم استخدام الرش المباشر بهذا المبيد الحيوي.

استهدفت هذه الدراسة إلى البحث عن عزلات جديدة وفريدة من بكتريا باسيليس ثيرنجينسيس عن طريق عزل هذه البكتريا من يرقة دودة ورق القطن مصابة بهذه البكتريا. ولقد أظهرت العزلات المحلية كفاءة عالية في قتل العديد من الحشرات التابعة لرتبة حرشفية الأجنحة (مثل دودة اللوز القرنفلية - دودة ورقة القطن - ودودة حرير الخروع) عند مقارنتها ببعض السلالات العالمية كالسلالة كروستاكي، وبرلينر والستى، وتولورثى. لقد تم عزل وكلونة جين سام جديد من إحدى هذه العزلات المحلية المصرية لبكتريا باسيليس ثيرنجينسيس *Bacillus thuringiensis* والتي أثبتت كفاءة عالية في قتل العديد من الحشرات التابعة لحرشفية الأجنحة عند مقارنتها بالعزلات المصرية الأخرى وأيضاً السلالات العالمية ولقد استخدم العديد من التقنيات لتعريف هذه العزلات

المصرية من البكتريا باسيلليس ثيبرنجنسيس وكذلك عزل وكلونة الجين المسئول عن إنتاج هذا البروتين السام.

يمكن تلخيص الخطوات التي أتبعنا في عزل وتعريف العزلات المصرية من بكتريا باسيلليس ثيبرنجنسيس وكذلك عزل وكلونة الجين المسئول عن إنتاج هذا البروتين السام فيما يلي:

١. تم عزل العزلات المحلية من بكتريا باسيلليس ثيبرنجنسيس من يرقة دودة القطن مصابة بهذه البكتريا باستخدام طريقة (Travers, et al., 1987).
٢. تحليل محتوى البروتيني لكل من الخلايا الحضرية والمتجرثمة باستخدام طريقة SDS-PAGE للدراسة التشابه والاختلاف بين هذه العزلات وأيضا مقارنتها ببعض العزلات العالمية للبكتريا باسيلليس ثيبرنجنسيس مثل كروستاكي، تينبروينس، وابزرايلنيسيس. ولقد وجد أن بعض الطرز البروتينية لهذه العزلات متشابه مع بعضها ولكن على الجانب الآخر مختلف تماما عن السلالات العالمية.
٣. تحليل ومقارنة المحتوى البلازميدي لكل من العزلات المحلية لدراسة الاختلافات الوراثية لهذه العزلات ولقد وجد أن المحتوى البلازميدي لكل من هذه العزلات مختلف بعضها عن بعض (Bron, 1990).
٤. اختلاف البصمات الوراثية لكل من المحتوى البلازميدي والمحتوى الكروموسومي لكل من العزلات المصرية عن بعضها البعض عند هضمها ببعض أنزيمات القطع المحددة التي تقطع ال د . ن . أ. في أجزاء معينة كما في طريقة (Gill et al., 1985) مما يؤكد الاختلافات والتباين الوراثي بين هذه العزلات قيد الدراسة.
٥. استخدام التفاعل السلسلي للبوليميراز (Gleave et al., 1993 and Carozzi et al., 1991) لمعرفة وجود الجينات المسئولة عن إنتاج البروتينات السامة من عدمها. ولقد أوضحت النتائج أن كل العزلات المصرية تحتوي على جين البروتين السام لترتبة حرشفية الأجنحة وبعضها يحمل الجين المسئول عن إنتاج البروتين المزدوج التأثير على كل من غمدية الأجنحة وحرشفية الأجنحة والبعض الآخر يحمل التأثير على كل من حرشفية الأجنحة وغمدية الأجنحة.
٦. عزل وكلونة وتوصيف جزئي لجين سام جديد من العزلة المحلية SYI من خلايا مكتبة وراثية للمحتوى البلازميدي للعزلة في بكتريا أشريشيا كولاي باستخدام إحدى إنزيمات القطع المتخصصة والمحددة للمادة الوراثية د.ن. أ (HincII).

تمت دراسة هذا الجين باستفاضة حيث وجد أنه محمول على قطعة من ال د. ن. أ
تتكون من ٣٨٥٩ قاعدة نيتروجينية حيث تم التأكد من كلونة هذا الجين بواسطة استخدام
العديد من التقنيات التأكدية.

أ- تحديد التتابع النيكلوتيدى لهذا الجين السام باستخدام الطريقة الأنزيمية كما وصفها
(Sanger et al., 1977) بواسطة بادئات متخصصة على جانبي موقع الكلونة في
البلازميد الحامل وأيضا استخدام بادئات متخصصة لهذا الجين السام وعمل تحت
كلونة لهذا الجين وذلك بتقطيع هذا الجين الى قطع أصغر وكلونة هذه القطع
الصغيرة. تم بناء حوالي سبعة تحت كلون من هذا الجين للمساعدة في إيجاد التتابع
النيكلوتيدى لهذا الجين. ولقد تم تحديد التتابع النيكلوتيدى لهذا الجين بالكامل وأيضا
تم تحديد نقطة بداية التعبير الجينى بواسطة الأحماض النووية الريبوسومية المختلفة
والتي تترجم الشفرات الوراثية كما تم تحديد المواقع التي تتحكم في تشغيل وتوقيف
التعبير الجينى.

ب- وبمقارنة التتابع النيكلوتيدى للجين السام من العزلة المصرية بالجينات المعزولة
من السلالات الأخرى والمتاحة في البنك الجينى حتى الآن وجد أن هناك تشابه كبير
بين التتابع النيكلوتيدى لهذا الجين والتتابع النيكلوتيدى للجين السابق من السلالة
كروستاكى أتش داي ١ وايزوا حيث كانت درجة التشابه مع هذه الجينات حوالي ٩٥
% لقد تركزت معظم هذه الاختلافات في (Domain II) حيث يرتبط هذا
(Domain II) بالمستقبلات في المعى المتوسط للحشرات تمهيدا لقتلها. كما وجد أن
حوالي ٢٧ حامض أميني في هذه المنطقة من البروتين السام مختلفة عن أقرب
البروتينات المتشابه مما أدى إلى تغيير في تركيب هذا البروتين وزيادة ظاهرة كرهه
للماء في هذا الجزء من البروتين، وهذا تفسير للقدرة العالية على قتل الحشرات
بواسطتها عند مقارنتها بالعزلات العالمية. أوضح التحليل الدقيق النيكلوتيدى أن
٣٧٢٥ قاعدة نيتروجينية تكون تركيب واحد مفتوح للجين السام وتبدأ من شفرة رقم
واحد ATG وتنتهي عند رقم ٣٧٢٥ وهي الشفرة TAG. عند ترجمة الشفرة
الوراثية لهذا الجين وجد أن البروتين الناتج له وزن جزيئى ٨، ١٣٣ كيلو دالتون
ويتكون من ١١٧٦ حامض أميني.

ج- تم إنتاج البروتين السام للجين المكلون في بكتريا أشريشيا كولاي بكفاءة عالية ولقد
تم استخلاصه بطريقة (Hofte et al., 1986) وتم اختبار هذا البروتين في
التفاعلات المناعية مع أجسام مضادة متخصصة ضد البروتينات السامة لحشريات

الأجنحة المستخرجة من كل من السلالة الكروستاكي والسلالة برلينر وذلك بطريقة الانتشار المزدوج وأوضحت الدراسة أن هناك تماثل مناعي عالي بين البروتين المعزول من السلالة المصرية وهذه البروتينات المعزولة من السلالات العالمية رغم الاختلافات الواضحة في درجة السمية بينهم.

د- تم دراسة فاعلية البروتين المنتج بواسطة بكتريا أشريشيا كولاي على حشرة دودة ورقة الطبايق المقرنة ووجد أن ٢ نانو جرام من هذا البروتين لكل ١ سم^٢ من الوسط الصناعي الذي تتغذى عليه الحشرة تقضى على ٥٠% من الحشرات المستخدمة في التجربة.

هـ - تم تحديد المستقبل Receptor لهذا البروتين السام بواسطة إجراء تجربة Ligand blot هي عبارة عن تعليم هذا البروتين بذرة يود مشع ١٢٥ وقد وجد أن هذا البروتين يرتبط مع مستقبل بروتين في الخلايا المبطنة للمعى المتوسط للحشرة في دودة الطبايق المقرنة وهذا المستقبل البروتيني له وزن جزيئي حوالي ٢١٠ كيلو دالتون.

مما سبق يتضح القدرة الفائقة للعزلات المحلية في قتل الحشرات عند مقارنتها بالسلالات العالمية مما يجعل هذه العزلات قابلة للاستخدام في تصنيع المبيدات الحشرية لحماية البيئة المحلية من التلوث الكيميائي الناجم عن استخدام المبيدات الحشرية في الزراعة. وأيضا استخدام الجين المعزول في إنتاج نباتات محورة وراثيا لها القدرة على مقاومة الحشرات.

٦- تعظيم إنتاج سموم الباسيلليس ثيورنجنسيس" للسيد / أشرف فرج الباز حواس
للحصول على درجة دكتوراه فى العلوم من كلية العلوم - جامعة الزقازيق تحت
إشراف أ.د. مجدى أحمد عبد السلام مذكور ، أ.د. رجب محمد عبد العزيز ، أ.د.
جيهان على الشربيني ١٩٩٩

لقد بدأ استخدام المبيدات الكيماوية بصورة واسعة فى القرن العشرين بعد نهاية
الحرب العالمية الثانية وأخذ استهلاك هذه المبيدات فى التزايد حتى وصل الى معدل تجاوز
ثلاثة ملايين طن فى عام ١٩٨٥، ونظرا لاستخدام هذه المبيدات الكيماوية بصورة غير
منظمة وبطريقة عشوائية أدى ذلك إلى التأثير السلبي المباشر على الجنس البشرى، حيث
أنه كل عام هناك ما يزيد على خمسة وعشرين مليون فلاح يصابون بحالات تسمم من
جاء استخدامهم لهذه المبيدات، وكذلك امتد الأثر إلى الأعداد الطبيعية للحشرات والتي بدأ
عددها فى التناقص بصورة شديدة ، وكذلك أدى تقامي المناعة المكتسبة ضد هذه المبيدات
الى عدم جدوى استخدامها إلا إذا كان ذلك بمعدلات عالية.

نظرا لما ظهر من أثر سئى لاستخدام المبيدات الكيماوية فقد بدأ فى الآونة الأخيرة
الالتفات بصورة كبيرة الى استخدام المبيدات الحيوية على الرغم من اكتشافها فى أوائل
القرن العشرين، وكان من أهم هذه المبيدات ذلك المبيد المستخرج من البكتيريا العنقودية
Bacillus thuringiensis والتي اكتسب شهرة واسعة لقدرتها على مكافحة الكثير من
الآفات وخاصة الزراعية منها. وتتميز بكتيريا *Bacillus thuringiensis* بقدرتها على
إنتاج بروتينات بلورية الشكل أثناء عملية تفرثتها، وهذه البروتينات لها القدرة على قتل
الحشرات التابعة لرتبة حرشفية الأجنحة وثنائية الأجنحة.

نظرا لأهمية هذا المبيد الحيوي من الناحية الاقتصادية حيث أنه يشكل حوالي ١%
من إجمالي مبيعات المبيدات عموما فى العالم فإن معظم الشركات العالمية اهتمت به
وقامت بإنتاجه على المستوى الصناعي مثل شركة Abbott Lab. & Sandoz . وبالطبع
اعتبرت الظروف المحيطة بعملية الإنتاج أحد أهم أسرار هذه الشركات ولذلك ندر النشر
حولها حيث أنه من حوالي ٢٠٠٠ بحث تم نشرهم عن *Bacillus thuringiensis* فى
الفترة من ١٩٨٠ - ١٩٩٠ لم يكن بينهم سوى اثنين وثلاثين بحثا تم نشرهم عن الإنتاج
وظروفه.

استهدفت هذه الدراسة محاولة تقديم صورة مبسطة لطريقة إنتاج مبيد حيوي يعتمد
أساسا على بكتيريا *Bacillus thuringiensis* بدءا من دراسة نوع بيئة النمو والخامات

المستخدمة ونسبة الكربون الى النتروجين وكذلك الظروف البيئية المختلفة وظروف ترسيب البروتينات البلورية المصاحبة للجراثيم. بعد ذلك تم إجراء تجربة نصف صناعية على مستوى مخمر سعة ٥٠٠ لتر ، وتم أخذ الناتج وأجريت عليه تجارب مختلفة بعدة تركيب Formulations ، وذلك لاختبار أفضلها وتجريبها على المستوى الحقلى ضد دودة ورق القطن، وفى النهاية تم تجريب زيادة نسبة الخامات المستخدمة ومضاعفاتها وذلك لزيادة نسبة البروتينات البلورية المنتجة.

وقد اشتملت الدراسة على التجارب الآتية:

١- تعيين أفضل نسبة كربون/ نيتروجين لإنتاج البلورات البروتينية والجراثيم باستخدام الجلوكوز وطحين فول الصويا، وكانت أفضل النسب هي "٢,٤٠، ١,٤٥" ، حيث أعطت نسبة جراثيم ١٠×٧ / مللي ، وفشلت النسب الأخرى "٣,١٨، ٣,١٦، ٤,٧٥" فى إنتاج البلورات البروتينية والجراثيم.

٢- تعيين أفضل نسبة كربون / نيتروجين فى إنتاج البلورات البروتينية والجراثيم باستخدام نشا الذرة وطحين فول الصويا ، وأعطت النسب المستخدمة كلها نتائج طيبة "٧٥، ٠، ٠، ٠، ١، ٣، ١، ٥، ١، ٢٥، ٢" . وكانت أفضل النتائج لنسبة كربون / نيتروجين هي نسبة "١، ٣" حيث أعطت أعلى نسبة جراثيم ١٠×٩ / مللي.

٣- تعيين أفضل مصدر كربوني باستخدام مصادر مختلفة نشا الذرة - لاكتوز - سكروز - مولاس - وبنفس نسبة الكربون / نيتروجين "١، ٣" وكانت أفضل النتائج باستخدام نشا الذرة حيث أعطت أعلى نسبة من إنتاج الجراثيم ١٠×٧ / مللي.

٤- تعيين أفضل مصدر نيتروجين باستخدام مصادر مختلفة "طحن فول الصويا - يوريا - سلفات الأمونيوم - جلوتين الذرة" وبنفس نسبة الكربون/ نيتروجين "١، ٣" ، وكانت أفضل النتائج باستخدام طحين فول الصويا ، حيث أعطت أعلى نسبة من إنتاج الجراثيم $١٠ \div ٨$ / مللي.

٥- تعيين أفضل مصادر طحين فول الصويا من مصادر محلية وكذلك مستوردة ، وأعطت جميع الأنواع المستخدمة نتائج متقاربة جدا من حيث إنتاجية البلورات البروتينية والجراثيم.

- ٦- تعيين أفضل درجة حرارة تحضين لتنمية الكائن وإنتاج الجراثيم والبلورات البروتينية ، ووجد أن درجة الحرارة ٣٠° م هي أفضل درجات الحرارة المستخدمة.
- ٧- تعيين أفضل درجة أس هيدروجيني لتنمية الكائن وإنتاج الجراثيم والبلورات البروتينية، ووجد أن مستوى الأس الهيدروجيني ٧-٧,٥ يعطي أفضل إنتاجية من حيث كمية الجراثيم 9×10^{11} / مللي.
- ٨- تعيين أفضل نسبة تلقيح للوسط الغذائي، ووجد أن نسبة تلقيح من ٤-٦ % تعطي أفضل النتائج (٦-٩ $\times 10^{11}$ / مللي).
- ٩- تعيين أفضل مستوى تهوية لإنتاج الجراثيم والبلورات البروتينية ، ووجد أن نسبة ٥٠ مللي "وسط غذائي" / ٥٠٠ مللي "حجم ورق" تعطي أعلى إنتاجية 9×10^{11} / مللي ، ولذلك استخدمت نسبة ١٠٠ مللي / ٥٠٠ مللي لإعطائها أعلى نسبة إنتاجية كلية.
- ١٠- تعيين أفضل نوع مضاد للرغوة : "زيت نرة - رودسيل سيليكون - سيجما " ٦٠٠٠ "سيليكون - ستركتول ٦٧٠ غير سيليكوني" ، ووجد أن أفضل نوع له القدرة على تثبيط الرغوى هو ستركتول ٦٧٠.
- ١١- تعيين أفضل تركيز من مادة فوسفات البوتاسيوم الثنائي القاعدية "١,٢,٣,٤,٥" جم / لتر. ووجد أن أفضل تركيز هو ٥ جم / لتر حيث أنه يعطي أعلى إنتاجية من الجراثيم 6×10^{11} / مللي.
- ١٢- تعيين أفضل تركيز من مادة كربونات الكالسيوم "١,٢,٣,٤,٥" جم / لتر ، ووجد أن أفضل تركيز هو ٣ جم / لتر حيث أنه أعطى نتائج متساوية مع التركيزات الأعلى ٤,٥ جم / لتر بعدد جراثيم 5×10^{11} / مللي.
- ١٣- تعيين أفضل تركيز من مادة الخميرة المعالجة في الوسط الحامضي والقاعدي وكذلك التي لم تعالج ، ووجد أن أفضل النتائج كانت باستخدام خميرة معالجة في وسط قاعدي بنسبة ٥ جم / لتر حيث أعطت أعلى نسبة جراثيم 11×10^{14} / مللي.
- ١٤- تعيين أفضل حامض أميني يمكن إضافته الى الوسط الغذائي ويؤدي إلى زيادة إنتاجية البلورات البروتينية والجراثيم ، ووجد أن حامض الجلوتاميك قد أعطى أفضل النتائج ٢ / ١٠ / مللي.
- ١٥- تعيين أفضل طرق فصل البلورات والجراثيم باستخدام تغيير قيمة الأس الهيدروجيني للوسط. وكذلك استخدام سلفات الأمونيوم والميثانول في الترسيب،

وقد وجد أن الأس الهيدروجيني "٤,٥" هي أفضل قيمة لترسيب البروتينات البلورية ، وأن نسبة ٢٥% من سلفات الأمونيوم هي أفضل نسبة تؤدي إلى الترسيب الكامل للبروتينات ، وأن استخدام الميثانول بنسبة ١:١ هي أفضل نسبة تؤدي إلى الفصل التام والتجفيف السريع للبلورات البروتينية والجراثيم.

١٦- تشكيل عدد ثمانية تراكيب مختلفة لتشكيل المنتج في صورته النهائية ، ووجد أن التركيبة رقم "٧" هي أفضل التراكيب ، حيث أنها تعطي أفضل نسبة قتل لدودة ورق القطن.

١٧- من نتائج التجارب السابقة تم الوصول إلى أفضل بيئة يمكن تطبيق نتائجها على مستوى المخمر النصف صناعي "٥٠٠ لتر". وتم متابعة المؤشرات الآتية خلال مراحل النمو المختلفة: الأس الهيدروجيني - نشاط إنزيم الأميليز - العدد الكلي - عدد الجراثيم الكلية - السكر الكلي - الوزن الجاف ، ووجد أن تنمية الكائن في المخمر تحت ظروف تشغيل محكمة من التهوية والتقليب أدت إلى زيادة الإنتاجية إلى ٢٥ جم/ لتر من البروتينات البلورية والجراثيم. وقد تم تجريب ناتج المخمر باستخدام التركيبة رقم "٧" ضد مركب "Dipel 2x" باستخدام تركيزات مختلفة ، ووجد أن تركيز ٥٠٠ جزء في المليون من هذه التركيبة أعطى أفضل نتائج ، كما تم حساب قيمة "جرعة قتل النصف LC - 50" والتي أعطت ١٠٠ جزء في المليون.

١٨- تم تجريب نتائج التجارب السابقة على المستوى الحقل "٢ فدان" بمنطقة بلقاس بالدقهلية ، وكان معدل الاستخدام هو ٢٠٠ جم / فدان ثلاث مرات متتالية بفواصل زمنية عشرة أيام ، وأظهرت النتائج التأثير الإيجابي للمنتج على مستوى فقص البيض والجيل الأول والثاني والثالث لدودة ورقة القطن.

١٩- دراسة تأثير مضاعفة مكونات بيئة النمو K "Lx, 1.5 x, 2x , 2.5 x, 3x" ، ووجد أن نسبة "2x" أعطت أفضل النتائج.

٢٠- دراسة تأثير استخدام مزيج من فول الصويا مع كل من سلفات الأمونيوم واليوريا كمصادر متنوعة للنيتروجين ، ووجد أن استخدام فول الصويا بنسبة ٧,٥ جم مع سلفات الأمونيوم بنسبة ٥٥ ، ٨ جم يعطي أفضل النتائج.

٧- دراسة بعنوان "زيادة فاعلية المبيدات الحيوية التي أساسها الباسيلليس ثوريخيبيسيس لمكافحة دودة ورق القطن" للسيدة/ فاطمة ابو بكر عطا الله للحصول علي درجة دكتوراه الفلسفة- كلية الزراعة جامعة القاهرة عام ١٩٩٩ تحت إشراف أ.د. أحمد عبد السلام بركات، أ.د. أحمد رؤوف حامد، أ.د. نبيل محفوظ إبراهيم.

تعتبر المبيدات الحيوية Bio-insecticides والتي تعتمد في تركيبها علي الميكروب الممرض للحشرات *B. thuringiensis* من الوسائل المناسبة والجيدة للاستخدام في إطار برامج مكافحة متكاملة للآفات وذلك لما تتميز به من مواصفات وكونها آمنة بالنسبة للأنواع الأخرى من الحشرات غير المستهدفة في برامج مكافحة وغير ضارة بالحشرات النافعة وبقية الكائنات الأخرى بما فيها الإنسان، فضلا علي انها قابلة للخلط بالمبيدات الحيوية الأخرى الممرضة للحشرات، والمبيدات الكيماوية والمواد الإضافية، اللاصقة، المبللة، والناشرة.

بالرغم مما سبق من مميزات فانه لازالت هناك بعض المشاكل والأسئلة المرتبطة باستخدام تلك المبيدات الحيوية، خاصة عند الاستخدام الجوي، والحاجة الي انتقاء وتنمية سلالات من هذا الميكروب يكون لها قدرة تأثير كبيرة علي يرقات بعض أنواع حرشفية الأجنحة مثل الأنواع التابعة لجنس *Heliothis* و *Spodoptera*. وعليه فزيادة فعالية المبيدات الحيوية التي تعتمد في تركيبها علي الميكروب *B. thuringiensis* أمر ضروري. ومن المعروف ان لهذا الميكروب فترة تأثير وبقاء قصيرة تحت الظروف الحقلية، كما أنه يؤثر كسم معوي ولا بد أن تأخذه اليرقات مع الغذاء ليعطي تأثيره ولما كانت دودة ورق القطن تتغذى علي أوراق نباتات القطن، ومعظم محاصيل الحقل والخضر (ولا زالت ذات أهمية اقتصادية كبيرة في مصر لما تسببه من خسارة كبيرة للمحاصيل رغم الجهود المبذولة لمكافحتها)، فإنها تصبح بذلك هدف جيد للمكافحة باستخدام المبيدات الحيوية، ويصبح من الضروري بذل جهود كبيرة وتبني وسائل مختلفة لرفع كفاءتها ضد تلك الآفة.

تم خلال هذه الدراسة إتباع وسائل وطرق مختلفة لزيادة تأثير عدة مبيدات حيوية علي دودة ورق القطن نذكر منها الآتي:-

١- انتخاب المبيدات الحيوية ذات الكفاءة العالية والتي تسبب أعلى نسبة للموت بين اليرقات المعاملة بالإضافة الي الآثار الأخرى علي طوري العذراء والحشرة

الكاملة وذلك من بين المعروض تجاريا بالسوق العالمي للتوصية باستخدامها عند اللزوم.

٢- استخدام المبيدات الحيوية التي تم تطويرها عن طريق الهندسة الوراثية.
٣- إضافة بعض الأملاح غير العضوية غير السامة الي المبيدات الحيوية لزيادة فعاليتها.

٤- إضافة تركيزات منخفضة من المبيدات الكيماوية مثل الميثوميل (methomyl) والسيبيرمثرين (cypermethrin) الي بعض المستحضرات الحيوية ودراسة تأثيرها علي الأعمار المختلفة لدودة ورق القطن.

٥- إضافة بعض مستخلصات النيم مثل Neemix والـ Agroneem للمبيدات الحيوية المختلفة في محاولة لزيادة تأثيرها.

٦- إضافة بعض المبيدات الحشرية ذات المصدر الطبيعي مثل الـ Vertimec الي بعض المبيدات الحيوية.

٧- إضافة تركيزات منخفضة من محتويات المعدة الوسطي لليرقات العالية الحساسية للإصابة بالميكروب *B. thuringiensis* مثل يرقات دودة الحرير الي بعض المستحضرات الحيوية تحت الاختبار لزيادة تأثيرها.

٨- بالإضافة الي ما سبق من دراسات تم إجراء دراسة علي تأثير المبيدات والمواد المختلفة المستخدمة علي نمو وتطور خلايا الميكروب *B. thuringiensis* عند تسميتها علي الأجار مغذي لمعرفة بعض الآثار الجانبية لعملية الإضافة إن الخلط إن وجدت.

كما تم عمل تحليل الكترولفوريزسس electrophoresis لمحتويات المعدة من البروتينات لكل من اليرقات المعاملة وغير معاملة لأحد أنواع الحشرات العالية الحساسية للإصابة (دودة الحرير)، ولأحد أنواع الحشرات المتوسطة الحساسية للإصابة (دودة ورق القطن) وأخري لأحد أنواع الحشرات القليلة الحساسية للإصابة (الدودة القارضة)، بالإضافة الي إجراء نفس التحليل علي المكون البيروتييني للإندوتوكسين Endotoxin الخاص بالميكروب *B. thuringiensis*.

ويمكن تلخيص النتائج الهامة ذات القيمة التطبيقية التي أمكن التوصل اليها فيما يلي:

١- للمبيدات الحيوية التي تم اختبارها وهي -Dipel 2X, Dipel ES/NT, Ecotech Bio, Delfin, MVP II تأثير قوي علي يرقات العمرين الثاني والرابع لدودة

ورق القطن غير أن يرقات العمر الثاني كانت أكثر حساسية. هذا ويمكن ترتيب المستحضرات الحيوية بناء على التركيز الذي يقتل ٥٠ ٪ من اليرقات بعد ٧ أيام من المعاملة كالآتي:-

| المستحضر الحيوي | LC ₅₀ |
|-----------------|------------------|
| a- MVPII | 0.26 ml/L |
| b- Dipel ES/NT | 0.34 ml/L |
| c- Dipel 2X | 0.41 g/L |
| d- Ecotech-Bio | 0.73 g/L |
| e- Delfin | 1.2 g/L |

بالإضافة إلى تقدير النسبة المئوية للموت على الطورين الثاني والرابع حتى ١٤ يوما من تاريخ بدء المعاملة، فقد تم أيضا تقدير تأثير المستحضرات الحيوية على النسبة المئوية للتعذير ووزن العذاري والنسبة المئوية للتشوه الحادث بها والنسبة المئوية لخروج الفراشات والنسبة المئوية للتشوه الحادث بها لإعطاء صورة كاملة عن التأثيرات المباشرة وغير المباشرة للمبيدات الحيوية على دودة ورق القطن في أطوارها المختلفة.

٢- في كل المعاملات التي استخدمت فيها المبيدات الحيوية السابقة الذكر ضد يرقات العمر الرابع لدودة ورق القطن حدث انخفاض في النسبة المئوية للتعذير، ومتوسط وزن العذاري، والنسبة المئوية لخروج الفراشات، وزيادة في النسبة المئوية للتشوهات بالعذاري والفراشات الناتجة عنها.

٣- ثبت أن المبيد الحيوي MVPII أقوى المبيدات التي تم تجربتها، وقد تم تطويره عن طريق الهندسة الوراثية بنظام (cell cap system) أي أن بلورات السم الداخلي للميكروب Endotoxin of B. thuringiensis يتم تخليقه داخل ميكروب آخر ممرض للحشرات وهي Pseudomonas fluorescens وذلك بهدف حمايته من الظروف البيئية عند الاستعمال عن طريق غلاف البكتريا المحيطة به.

٤- إضافة بعض الأملاح غير العضوية وغير السامة إلى المبيدات الحيوية زاد من فعاليتها، فعند إضافة كل من كبريتات الزنك بتركيز ٠,٢٥ جم/لتر أو كربونات الصوديوم بتركيز ٠,١٢٥ جم/لتر أو كربونات البوتاسيوم ٠,٣٢٥ جم/لتر زادت من فعالية المبيد Dipel 2X ضد يرقات العمر الثاني وسجلت حالات من تنشيط

الفعالية (Synergistic effect) بلغت قيمتها ١٠,٨ ، ١٠,٢ ، ٣,١ أضعاف تأثير الـ Dipel 2X عند استخدامه بمفرده. أما في حالة يرقات العمر الرابع فقد كان التأثير أقل.

٥- أدي أيضا إضافة الأملاح غير العضوية السابقة الذكر الي المبيد الحيوي Ecotech-Bio الي زيادة فعاليته ضد يرقات العمر الثاني.

٦- أمكن زيادة فعالية المبيدات الحيوية بإضافة تركيزات منخفضة من بعض المبيدات الكيماوية وأدي البعض منها الي تأثير مثبت كما يلي:-

(أ) وجد تأثير مثبت عند إضافة الميثوميل methomyl (مجموعة الكربمات Carbamate group) الي المبيد الحيوي Dipel 2X، وقد تراوحت قيمة الـ Co-toxicity factor من ٣١,٤-٥١,٠ وعليه فإن إضافة الميثوميل الي مستحضرات الميكروب B. thuringiensis غير مرغوب فيها.

(ب) أدي إضافة المبيد الكيماوي السبيرمثرين cypermethrin (من مجموعة Pyrethroid group) بتركيزاته المختلفة (١,١٧ ، ٢,٣٤ ، ٤,٦٨ ، ٩,٣٧ ، ١٨,٧٥ ، ٣٧,٥ جزء من المليون) الي المبيد الحيوي Dipel 2X الي وجود زيادة في فعالية بدرجات مختلفة بين التنشيط والإضافة (Synergistic, potentition or additive effects) وذلك ضد يرقات العمر الثاني لدودة ورق القطن.

(ج) سجلت أعلى نسبة لزيادة الفاعلية عند إستخدام خليط يتكون من السبيرمثرين بتركيز ٤,٦٨ جزء في المليون و Dipel 2X بتركيز ٠,٢٥ جم/لتر وأقل درجة من التنشيط عند استخدام خليط منهما بتركيز Cypermethrin (١,١٧ جزء في المليون) و dipel 2X (٠,٢٥ او ٠,٥ جرام/لتر).

(د) أوضحت الخلائط المستخدمة من كل من السبيرمثرين والـ Dipel 2X بتركيزاتها المختلفة تأثير مثبت علي كل من تكوين العذاري ومتوسط وزن العذاري الخارجة من اليرقات العمر الرابع المعاملة وكذلك نسبة خروج الفراشات، كما أدت الي زيادة نسبة التشوهات بالعذاري والفراشات، مما يؤثر علي تعداد الحشرة في الأجيال التالية.

٧- عند إضافة تركيزات منخفضة من الـ Neemix (مستخلص من النيم) الي المبيد الحيوي Dipel 2X أو المبيد الحيوي Ecotech-Bio أدي ذلك الي زيادة في النسبة المئوية لموت يرقات العمر الثاني ويمكن وصفها بأنها تأثير تكميلي an

additive effect بينما أدت التركيزات العالية منه الي حدوث تأثير مثبط
antagonistic effect .

٨- عند إضافة تركيزين قدرهما ٥٠ و ١٠ جم/لتر من الـ Neemix الي Dipel 2X بتركيزات ٠,١٢٥,٠٠,٢٥,٠٠,٥,١,٠ جم/لتر حدث تأثير تكميلي وعند زيادة تركيز الـ Neemix الي ٢٠ مل/لتر حدث تأثير مثبط.

٩- يمكن استخدام الخلاط من الـ Dipel 2X بتركيزات ٠,١٢٥,٠٠,٢٥,٠٠,٥,١,٠ جم/لتر مع الـ Neemix بتركيزات ٥,١,٠,٢٠ مل/لتر ضد يرقات العمر الرابع لدودة ورق القطن بنجاح حيث ارتفعت نسبة الموت وأعلى تأثير تكميلي (aditive) او مقوي (potention) كما تأثر بشدة تكوين العذاري ووزنها، ونسبة خروج الفراشات، وربما يعود ذلك الي التغيرات الفسيولوجية الكثيرة التي تحدث بيرقات دودة ورق القطن في أعمارها الأخيرة قبيل التغذية. وعليه فيمكن استخدام خلاط الـ Neemix مع المبيد الحيوي Dipel 2X بنجاح ضد يرقات العمر الرابع لدودة ورق القطن.

١٠- أدت إضافة الـ Neemix بتركيزات ٥,١,٠ مل/لتر الي المبيد الحيوي Ecotech-Bio بتركيزات ١,٢٥,٢,٥,٥,٠ جم/لتر الي زيادة في الفاعلية ضد يرقات العمر الثاني يمكن وصفها بأنها potentition او additive بينما عند زيادة تركيز الـ Neemix الي ٢٠ مل/لتر أدى ذلك الي وجود تأثير مثبط.

١١- في كل حالات استخدام خلاط من الـ Neemix مع أي من المبيدين Dipel 2X, Ecotech-Bio ضد يرقات العمر الرابع أدى ذلك الي خفض في النسبة المئوية للتغذير، متوسط وزن العذاري، والنسبة المئوية لخروج الفراشات، وزيادة التشوهات بالعذاري والفراشات الناشئة.

١٢- بلغت النسبة المئوية للتشوه لعذاري ١٠٠% عند معاملة يرقات العمر الرابع لدودة ورق القطن بالأجرونيم Agroneem بتركيز قدره ٥ مل/لتر.

١٣- أدى إضافة مبيد الأجرونيم Agroneem بتركيزات قدرها ٢,٥,٥ مل/لتر تركيزات مختلفة من المبيد الحيوي Dipel.2X بتركيزاته المختلفة ٠,١٢٥,٠٠,٢٥,٠٠,٥,١,٠ جم/لتر واستخدامه ضد كل من يرقات العمرين الثاني والرابع الي حدوث تأثير مثبط (antagonistic effect) ويتكرر ذلك مع المبيد الحيوي

Ecotech-Bio ولذلك لا ينصح بإضافة الـ Agroneem الى المبيدات الحيوية لمكافحة الأعمار اليرقية.

١٤- رغم التأثير المثبط للمبيد Agroneem علي كل من المبيد الحيوي Dipel 2X، والمبيد الحيوي Ecotech Bio إلا أنه أدى الى انخفاض ملحوظ في النسبة المئوية لتكوين العذاري، وانخفاض متوسط وزن العذاري، وانخفاض النسبة المئوية لخروج الفراشات، كما أدى الى زيادة النسبة المئوية لتشوه العذاري والفراشات الناتجة عن معاملة يرقات العمر الرابع.

١٥- أمكن زيادة فاعلية المبيدات الحيوية Dipel 2X, Ecotech -Bio بإضافة تركيزات مختلفة من المبيد Vertimec الي تركيزات مختلفة واستخدامها لمعاملة يرقات العمرين الثاني والرابع.. كما يلي:

(أ) عند استخدام خلأط من الـ Dipel 2X (بتركيزات مختلفة ٠,٢٥، ٠,٥، ١,٠، ٠,٢٥، ٠,٥، ١,٠ جم/لتر) والـ Vertimec (بتركيزات مختلفة ٠,٢٥، ٠,٥، ١,٠ جم/لتر) لمعاملة يرقات العمرين الثاني والرابع سجلت تأثيرات منشطة له في كل المعاملات Synergistic effect تم تقديرها حسابيا وتراوح قيمتها بين ١,٠ و ٣,٤ ولم يحدث تأثير منشط في حالتين فقط وذلك عند استخدام خليط مكون من Dipel 2X (٠,٢٥ جم/لتر) و Vertimec بتركيزات قدرها ٠,٢٥، ٠,٥، ١,٠ مل/لتر لمعاملة العمر الثاني لدودة ورق القطن.

(ب) وجد ايضا تأثير منشط (Synergistic effect) للمبيد Vertimec عند خلطه بتركيزات ٠,٥، ١,٠، ٠,٢٥ مل/لتر مع المبيد الحيوي Ecotech-Bio بتركيز قدره ١,٢٥ جم/لتر واستخدمت لمعاملة يرقات العمر الثاني.

(ج) من الأهمية بمكان تقرير ان خلأط الـ Vertimec مع المبيدين الحيويين Dipel 2X, Ecotech-Bio ادي في جميع الحالات الي خفض النسبة المئوية للتعذير، والنسبة المئوية لتشوه العذاري والفراشات، فعلي سبيل المثال بلغت النسبة المئوية للتعذير الناشئة من يرقات العمر الرابع غير المعاملة ٩٢% وتراوح بين ٤٠-٦١% فقط عند معاملة يرقات العمر الرابع بخلأط من Vertimec , Ecotech-Bio. وعليه فان زيادة النسبة المئوية للموت باليرقات في الأعمار المختلفة والتأثيرات الجانبية علي طوري العذراء والفراشات تؤكد

إمكانية التوصية بإضافته الي المبيدات الحيوية لزيادة فعاليتها لمكافحة دودة ورق القطن خاصة وأن الـ Vertimec غير ضار بالحشرات النافعة.

١٦- ثبت من التجارب خلال هذا البحث ان محتويات المعدة الوسطي midgut contents لليرقات الغير معاملة من الأنواع عالية الحساسية للإصابة بالميكروب *B. thuringiensis* مثل ديدان الحرير *B. mori* تزيد من فاعلية المبيدات الحيوية عند إضافتها إليها بتركيزات منخفضة واستخدامها في معاملة يرقات العمر الثاني لدودة ورق القطن. وعلى سبيل المثال، بلغت النسبة المئوية للموت بيرقات العمر الثاني لدودة ورق القطن. وعلى سبيل المثال، بلغت النسبة المئوية للموت بيرقات العمر الثاني بعد ٧ ايام من تغذيتها علي نباتات قطن معاملة بالمبيد الحيوي Dipel 2X بتركيز ١,٠ جم/لتر (٥٨,٦%)، وارتفعت تلك النسبة الي (٨٠,٦%) عند إضافة محتويات المعدة الوسطي لديدان الحرير في عمرها الخامس الي المبيد الحيوي Dipel 2X.

١٧- سجلت ١٧ حالة من حالات Synergistic effect من ٢٠ معاملة مختلفة بتركيزات مختلفة لخلائط من محتويات المعدة الوسطي لديدان الحرير والمبيد الحيوي Dipel 2X وتراوح قيمة Synergistic factor بين ١,٠-٢,٧.

١٨- حدث تأثير منشط ايضا لإضافة محتويات المعدة الوسطي لديدان الحرير الغير معاملة الي المبيد الحيوي Ecotech-Bio وسجلت ٧ حالات للتأثير المنشط من بين ١٥ معاملة مختلفة.

١٩- في دراسات مكملة لما سبق اختبار تأثير المواد والمبيدات السابق إضافتها الي المبيدات الحيوية بغرض زيادة تأثيرها، علي نمو الخلايا البكتيرية للميكروب *B. thuringiensis* علي الاجار المغذي وجد الاتي:-

(أ) تؤخر سلفات الزنك نمو الميكروب عند استخدامها بتركيز ٠,٢٥ جم/لتر للبيئة المغذية.

(ب) لا يوجد مثبط لكل من كربونات الصوديوم ١,٢٥ جم/لتر أو كربونات البوتاسيوم ٠,٣٧٥ جم/لتر.

(ت) ليس للمبيد الكيماوي cypermethrin أي تأثير مثبط علي نمو الميكروب علي بيئة الاجار مغذي.

ث) أدى المبيد الكربماتي الميثوميل methomyl الى حدوث تثبيط لنمو الميكروب على سطح اجار المغذي.

ج) ليس لكل من مستخلصات النيم Agroneem, Neemix أية تأثيرات مثبطة على نمو الميكروب.

ح) ليس لمبيد الـ Vertimec تأثير مثبط على نمو الميكروب.

وفي ضوء النتائج السابقة يمكن التوصية بإضافة أي من المبيدات أو المواد التي ثبت أنها تزيد من فاعلية المبيدات الحيوية التي تم تجربتها فيما عدا (على سبيل الحذر الميثوميل) مع ملاحظة أن مستحضرات الميكروب B. thuringiensis سواء في شكل معلقات أو مسحوق قابلة للبلل لا تحتوي على خلايا خضرية للميكروب وإنما تحتوي جراثيم الميكروب، وبللورات الاندوتوكسين وكلاهما لا يتأثر بالمبيدات فضلا على استخدامه مباشرة على النبات لا يعطي فرصة للإنبات الجراثيم قبل الاستخدام.

٢٠- نتائج تحليل الـ electrophoresis لبروتينات محتويات المعدة الوسطى ليرقات معالجة وغير معالجة من الأنواع العالية الحساسية للإصابة بالميكروب B. thuringiensis (مثل دودة الحرير) والمتوسطة (دودة ورق القطن) والقليلة الحساسية (مثل الدودة القارضة)، وكذلك تحليل المكون البروتيني لبللورات الاندوتوكسين Endotoxin - crystal للميكروب تثبت لنا أن المعدة الوسطى لليرقات خاضعة ذات الوزن الجزيئي القليل عن اليرقات المتوسطة أو قليلة الحساسية للإصابة. وأنه قد حدث انخفاض في كمية البروتينات التي تمثل البروتينات المكونة لبللورات الاندوتوكسين بعد المعاملة بصورة واضحة في اليرقات الحساسة تليها المتوسطة ثم القليلة الحساسية للإصابة بالميكروب مما يفسر امتصاصها أو نفاذها خلال جدار المعدة الوسطى مما يسرع من حدوث عملية الشلل بالمعدة الوسطى ثم موت اليرقات بعد ذلك طبقا للأعراض المعروفة عند الإصابة.

وتمثل النتائج المتحصل عليها من خلال تلك الدراسات والتجارب قيمة تطبيقية عالية ويمكن الاستفادة بها في برامج مكافحة المتكاملة لمكافحة دودة ورق القطن بالمبيدات الحيوية فضلا عن إعطاء كثير من المعلومات الخاصة بالعلاقة بين المواد المضافة لزيادة الفاعلية ونمو الميكروب، والفروق من المكون البروتيني لمحتويات المعدة الوسطى لليرقات الحساسة والأقل حساسية وماذا يحدث بعد المعاملة بالمبيد الحيوي.

٨- دراسة بعنوان "دراسات عل عزلات مختلفة من التربة المصرية للباسبيللوس ثوريخينسيز وفعاليتها ضد دودة ورق القطن سبودوبترا ليتوراليس" للباحثة/ نجلاء عطا الله مهني عمر كلية الزراعة جامعة القاهرة عام ١٩٩٩.

يعتبر ميكروب *Bacillus thuringiensis* من أهم الكائنات التي تم استخدامها بنجاح وعلى نطاق واسع ضمن برامج مكافحة المتكاملة للآفات في السنوات الأخيرة، لما يتميز به من تخصص شديد وفعالية عالية تجاه آفات محددة بالإضافة إلى مستوى الأمان المرتفع تجاه العديد من الحشرات النافعة والكائنات الأخرى (Swirski et al. 1988) ولذلك فإن استخدامه كبديل للمبيدات الكيماوية والتي تؤثر تأثيرا سلبيا على مختلف مظاهر الحياة يساهم في الحفاظ على البيئة من التلوث وعدم تكوين الآفات مقاومة ضده (Sneh and Schuster, 1983).

نظرا لأهمية هذا الميكروب في مجال مكافحة الميكروبية للآفات الحشرية تقوم الدول المتقدمة وبعض من الدول النامية بإنتاج هذا الميكروب في مستحضرات تجارية يتم تسويقها عالميا، وتستورد مصر كميات منه لمكافحة بعض الآفات، مثلها كدول أخرى، واستيراد هذه المستحضرات يحمل ميزانيات هذه الدول قدرا من العملات الصعبة، لذلك اتجهت بعض الدول مثل الهند ودول شرق آسيا وجنوب أفريقيا ومصر وغيرها من الدول النامية إلى استكشاف ثرواتها الطبيعية من هذا الميكروب النافع لاستغلاله في مكافحة الآفات الحشرية.

تهدف الدراسة الحالية لاستكشاف عزلات لهذا الميكروب من عدد من المحافظات في مصر بهدف تقويمها من نواحي عدة تخدم في مكافحة دودة ورق القطن ويتضمن برنامج الدراسة الحالية النقاط التالية:

١. الحصول على عزلات لميكروب *B. thuringiensis* من مواقع مختلفة في مصر.

٢. اختبار فعالية تلك العزلات ضد يرقات العمر الثاني لدودة ورق القطن *Spodoptera littoralis* على البرسيم باعتباره محصولا ذا أهمية اقتصادية ولا يحتوي على مواد ذات تأثير مثبط على ميكروب B.t.

٣. اختبار السلالات الأكثر فعالية على كل من البرسيم والخروع لإيضاح تأثير اختلاف أوراق العائل النباتي على فعالية الميكروب المختبر.

٤. اختبار فعالية العزلات المتحصل عليها من التربة المصرية على بيئة صناعية، لتلافي تأثير اختلاف أوراق العوائل النباتية المختلفة.

٥. دراسة منحني النمو للعزلات التي أعطت أعلى نسب أماته ضد الحشرة علي البيئة الصناعية لمعرفة أفضل وقت لحصاد جراثيم تلك العزلات في حالة إنتاجها علي نطاق أوسع لاستخدامها في مكافحة.

وقد أوضحت الدراسة الآتي:

(١) تم الحصول علي ١٣ عزلة لميكروب B.t. من عينات التربة التي تم جمعها من ٧ محافظات مختلفة في مصر حيث تم التعرف علي هذه العزلات عن طريق الصفات المزرعية والفحص الميكروسكوبي بالإضافة إلى الاختبارات البيوكيميائية.

(٢) تم إنتاج عزلات B.t. المتحصل عليها علي بيئة Nutrient agar في المعمل للحصول علي معلق الجراثيم والبلورات لكل منها لاستخدامه في التجارب الخاصة بتقدير مدي فعالية تلك العزلات تجاه الحشرة المستهدفة في الاختبار (بودة ورق القطن S. Littoralis).

(٣) أظهرت نتائج اختبار فعالية عزلات الـ B.T المتحصل عليه ضد يرقات العمر الثاني لبودة ورق القطن علي نبات البرسيم باستخدام تركيز واحد وهو (٥١٢ x جرثومة/ملي) أن تلك العزلات اختلفت في مدي فعاليتها تجاه الحشرة المستهدفة حيث قسمت تلك العزلات وفقا لدرجة فعاليتها الي ثلاثة مستويات كالآتي:-

• عزلات فعالة والتي أحدثت نسبة موت أعلى من ٤٤٪ وتضمنت ثلاث عزلات هي:-

• GH-1 (٥٣,٣٪)، DK-2 (٥٠٪)، GH-2 (٤٦,٦٪)

• عزلات متوسطة الفعالية والتي أحدثت نسبة موت تراوحت بين ٢٥-٤٤٪ وتضمنت عزلة واحدة هي KF-2 (٢٦,٦٪).

• عزلات منخفضة الفعالية والتي أحدثت نسبة موت أقل من ٢٥٪ وتضمنت ٩ عزلات :-

KF-1 (٢٣,٣٪)، DK-1 (٢٠٪)، MN-2، SH-2 (١٣,٣٪)، SH-1 (١٠٪)،

KL-1 (٩,٩٪)، DK-3 (٦,٧٪)، MN-1 (٣,٣٪).

٣-١. اختبرت أكثر السلالات فعالية والتي سببت نسبة موت أعلى من ٤٤ ٪ على كل من البرسيم والخروع باستخدام ٥ تركيزات مختلفة هي: ١٢٨، ٢٥٦، ٥١٢، ١٠٢٤، ٢٠٤٨ x ١٠^٦ جرثومة/ملي ضد يرقات العمر الثاني لنفس الحشرة المختبرة وأوضحت النتائج ما يلي:-

العزلة GH-1 وهي من محافظة الغربية أحدثت نسبة موت قدرها ٣٠,١ ٪ على ٣ ٪ عند تركيز ٢١٨ x ١٠^٦، ٥٣,٣ ٪ عند تركيز ٥١٢ x ١٠^٦، ٥٦,٦ ٪ عند تركيز ١٠٢٤ x ١٠^٦ بينما انخفضت إلى ٤٣,٣ ٪ عندما زاد التركيز إلى ٢٠٤٨ x ١٠^٦ جرثومة ٪ ملي وذلك مقارنة بنسب موت متذبذبة على الخروع بزيادة التركيز المستخدم، حيث زادت إلى ٥٣,٤ ٪ عند ٢٥٦ x ١٠^٦ ثم انخفضت إلى ٢٩,٩ ٪ عند التركيز ٥١٢ x ١٠^٦ ثم عادت للزيادة مرة أخرى ووصلت إلى ٥٣,٣ ٪ على تركيز ١٠٢٤ x ١٠^٦ منتهية بنسبة موت ٣٦,٣ ٪ عند أعلى تركيز.

العزلة GH-2 أحدثت نسبة موت متساوية على كل من الخروع والبرسيم (٣٦,٦ ٪) على تركيز ١٢٨ x ١٠^٦، بزيادة التركيز إلى ٢٥٦ x ١٠^٦ لم تحدث زيادة مقابلة في نسبة الموت على البرسيم بينما على الخروع ازدادت إلى ٤٣,٣ ٪ ثم تزايدت نسبة الموت على البرسيم بزيادة التركيز حتى وصلت إلى ٧٦,٦ ٪ عند أعلى تركيز مع ملاحظة أن زيادة التركيز من ٥١٢ x ١٠^٦ إلى ١٠٢٤ x ١٠^٦ لم يحدث أي زيادة في نسبة الموت على التركيز ٥١٢ x ١٠^٦. على الجانب الآخر كانت نسبة الموت على الخروع متذبذبة التركيز حيث انخفضت إلى ٢٣,٢ ٪ على التركيز ٥١٢ x ١٠^٦ ثم عادت للزيادة إلى ٤٦,٦ ٪ عند أعلى تركيز. العزلة DK-2 أحدثت نسبة موت مرتفعة على التركيز الأول (١٢٨ x ١٠^٦) مقارنة بالعزلتين السابقتين حيث كانت ٤٣,٣ ٪ على البرسيم، ٥٠ ٪ على الخروع ثم تزايدت نسبة الموت إلى ٧٦,٨ ٪ على البرسيم، ٥٦,٨ ٪ على الخروع بزيادة التركيز إلى ٢٥٦ x ١٠^٦ ثم تذبذبت نسبة الموت على كلا النباتين انخفاضاً وارتفاعاً بزيادة التركيزات حتى وصلت إلى ٢٠ ٪ على البرسيم ٤٣,٣ ٪ على الخروع عند أعلى تركيز مستخدم.

٢-٣. أجري اختبار فعالية آخر لعزلات B.t. ضد يرقات العمر الثاني لنفس الحشرة المختبرة باستبدال النباتات الطبيعية المستخدمة في الاختبارات السابقة ببيئة صناعية علي تركيز 1×10^7 جرثومة/ملي وقد أظهرت نتائج هذا الاختبار اختلاف في فعالية العزلات ضد الحشرة المختبرة حيث ترواحت نسبة الموت الحادثة بين ١٠ ٪، ١٠٠ ٪ وذلك في اليوم السابع بعد المعاملة.

٣-٣. من نتائج الاختبار السابق انتخبت السلالات الأكثر فعالية والتي أحدثت نسبة موت أعلى من ٨٥ ٪ وهي DK-2، DK-3، KF-1 (جميعها أحدثت نسبة موت ١٠٠ ٪) لتقدير فعاليتها ضد يرقات العمر الثاني لدودة ورق القطن علي البيئة الصناعية باستخدام ٧ تركيزات هي: 1×10^1 ، 1×10^2 ، 1×10^3 ، 1×10^4 ، 1×10^5 ، 1×10^6 ، 1×10^7 جرثومة/ملي بيئة صناعية وقد أظهرت النتائج ما يلي:-

أولاً: العزلة DK-2 أحدثت نسبة موت قدرها ٣,٣ ٪ في اليوم السابع علي التركيز 1×10^1 وتزايدت هذه النسبة بزيادة التركيز حتى وصلت الي ٨٩,٩ ٪ عند التركيز 1×10^5 بينما انخفضت الي ٨٣,٤ ٪ بزيادة التركيز الي 1×10^7 مع ملاحظة أن هذه النسبة قد انخفضت عن نسبة الموت الناتجة عند نفس التركيز في اختبار المفاضلة بين العزلات.

ثانياً: العزلة DK-3 أحدثت نسبة موت قدرها ٦,٧ ٪ في اليوم السابع علي التركيز (1×10^1) والثاني (1×10^2) ثم تزايدت هذه النسبة بزيادة التركيز المستخدم حتى وصلت الي ٩٣,٣ ٪ موت عند أعلى التركيز 1×10^7 حيث لوحظ ايضاً ان هذه النسبة انخفضت بفارق ٠,٧ ٪ عند استخدام نفس التركيز في اختبار المفاضلة بين العزلات حيث كانت ١٠٠ ٪.

ثالثاً: العزلة KF-1 أحدثت نسبة موت قدرها ٦,٧ ٪ في اليوم السابع علي التركيز الأول (1×10^1) والثاني (1×10^2) ثم تزايدت هذه النسبة الي ٣٣,٤ ٪ بزيادة التركيز الي 1×10^6 متشابه بذلك مع نسبة الموت التي أحدثتها العزلة DK-3 علي التركيزات الثلاث الأولى، بينما تزايدت نسبة الموت بعد ذلك بزيادة التركيز المستخدم حتي وصلت الي ١٠٠ ٪ علي أعلى تركيز مستخدم $(1 \times 10^7$ جرثومة/ملي).

٤) تم عمل منحني النمو لأكثر العزلات فعالية والنتيجة من اختبار المفاضلة بين العزلات علي البيئة الصناعية وهي العزلات KF-1، DK-3 وقد أوضحت تلك الدراسة ما يلي:-

أولاً: بالنسبة للعزلة KF-1 أعطت معدلات نمو متوازية من الخلايا الخضرية حتي وصلت لأقصى عدد من الخلايا الخضرية وهو 10×116 خلية/ملي بعد ٣٦ ساعة عند درجة pH ٧,٧٩، بينما أعطت أعلى عدد من الجراثيم وهو $10 \times 138,8$ جرثومة/ملي بعد ٨٤ ساعة عند درجة pH ٩ وبالتالي يمكن الحصول علي أقصى عدد من الجراثيم الخاصة بتلك العزلة بعد مرور ٨٤ ساعة من التلقيح (inoculation) تحت نفس الظروف الموضحة بالاختبار.

ثانياً: بالنسبة للعزلة KF-2 فقد تشابهت مع العزلة السابقة من حيث الأزمنة التي عندها وصلت كلا من الخلايا الخضرية والجراثيم أقصى عدد لها ولكنها اختلفت عن العزلة السابقة في تلك الأعداد، حيث كان أعلى عدد من الخلايا الخضرية لتلك العزلة هو $10 \times 132,7$ خلية/ملي بعد ٣٦ ساعة بينما كان أعلى عدد للجراثيم هو $10 \times 172,3$ جرثومة/ملي بعد ٨٤ ساعة وهو الزمن المناسب لحصاد جراثيم تلك العزلة عند الإنتاج. وقد لوحظ أيضاً ان العزلة DK-2 تعتبر أكثر إنتاجاً للجراثيم من العزلة KF-1 حيث أنها أعطت عدداً أكبر من الجراثيم وهو $10 \times 172,3$ جرثومة/ملي مقارنة بـ $10 \times 138,8$ جرثومة/ملي للعزلة KF-1 عند نفس الزمن علي الرغم من ان كمية اللقاح المستخدمة في الأخيرة 10×1 جرثومة/ملي أكبر من تلك المستخدمة في العزلة DK-2 وهي $10 \times 0,7$ جرثومة/ملي.

ثالثاً: بالنسبة للعزلة KF-3 فقد أعطت أعلى عدد من الخلايا الخضرية وهو 10×276 خلية/ملي بعد ٣٦ ساعة وعند نفس الزمن أعطت أعلى عدد للجراثيم وهو $10 \times 97,3$ جرثومة/ملي وهو يمثل زمن الحصاد لتلك العزلة وقد لوحظ أن هذه العزلة تميزت بإنتاجها القليل من الجراثيم.

٩- دراسة بعنوان "التداخل بين باسيلوس ثوريينجنسيس والنيماتودا الممرضة للحشرات في مكافحة دودة ورق القطن المصرية سبودوبتراليتوراليس" للسيد/ خالد حسين أحمد حسين للحصول علي درجة الماجستير في العلوم الزراعية من كلية الزراعة جامعة القاهرة عام ٢٠٠٠.

اثنان من أهم العناصر الممرضة للحشرات:

هي بكتريا *Bacillus Thuringiensis*، النيماتودا المنتمية إلى الجنس *Steinernema* و *Heterorhabditis* هي محل الاهتمام في الدراسة الحالية. تم بحث تأثير خليط من النيماتودا *STEINERMEMA CARPOCAPSAE* (WEISER) أو النيماتودا *HETERORHABDITIS BACTERIOBHORA* (POINER) مع مستحضرين تجاريين من البكتريا *BACILLUS* (DIPEL 2 X , DOLFEN) *THURINGIENSIS* VAR *KURSTAKI* ضد العمر اليرقي الرابع، الخامس، السادس، العذارى لحشرة فراشة ورق القطن المصرية *SPODOPTERA LITTORALIS*.

ويمكن تلخيص النتائج المتحصل عليها كالتالي:

١- التأثير علي العمر اليرقي الرابع: عند خلط *Steinernema carpocapsae* مع *Dipel 2x* كانت قيم LC_{90} بعد ٤٨ ساعة من المعاملة ٢٧,٨٩، ٢٧,٦١، ٤٩,٤٣، ٢١,١٢ طور يرقي معدي/يرقة بمعاملة النيماتودا بمفردها وعند خلطها مع *Dipel 2x* بتركيز ١، ٠,٠٥، ٠,٢٥ جم/لتر علي التوالي وهذه القيم قلت بعد ٩٦ ساعة من المعاملة ١، ١٣,٣٧، ١٥,٧٠، ٢٧,١٣، ٨,٤٦ طور يرقي معدي/يرقة من دودة ورق القطن لنفس المعاملات علي التوالي.

♣ عند خلط *S. carpocapsae* مع *Delfin* كانت قيم LC_{90} بعد ٤٨ ساعة من المعاملة كالتالي: ٢٧,٨٩، ٥,١، ٢٨,٠٢، ٣٠,٠٦، طور يرقي معدي/يرقة وذلك عند معاملة النيماتودا بمفردها وعند خلطها مع *delfin* بتركيزات ١، ٠,٠٥، ٠,٢٥ جم/لتر علي التوالي وبالمثل كانت القيم بعد ٩٦ ساعة من المعاملة ١٣,٣٧، ٥,١، ٢١,٥١، ٩,٨٢ طور يرقي معدي/يرقة لنفس المعاملات علي التوالي.

♣ عند خلط *H. bacteriophora* مع بكتريا *dipel 2X* كانت قيم LC_{90} بعد ٤٨ ساعة من المعاملة كالتالي: ٢٨,٥٥، ٦٣,٠١، ١٦,٩٦، ٢٢,١٦، وذلك بمعاملة

بعد ٩٦ ساعة من المعاملة، كل المعاملات أدت إلى موت كل اليرقات لسودة ورق القطن. معدل تواجد ونمو النيماتودا في اليرقات الميتة تتراوح بين ٤٦,٧٧ — ٩٠,٥٢ %، *S.carpocapsae*، ٥,٧٧ — ٣٦,٦٧ % للـ *H. bacteriophora*.

٣- التأثير على العمر اليرقي السادس

عند خلط *S.carpocapsae* مع *dipel 2X* كانت قيم LC_{90} بعد ٤٨ ساعة من المعاملة كالاتي: ١٦٢,٥٥، ١٤,٥٢، ٢٠,٦٥، ٢٢,٦٥ طور يرقي معدي/يرقة وذلك بالمعاملة بالنيماتودا بمفردها وعند خلطها مع *dipel 2x* بالتركيزات ١، ٠,٥٠، ٠,٢٥ جرام/لتر على التوالي. وعندما خلطت مع *Delfin* بالمثل كانت القيم ١٦٢,٥٥، ٢١,٠١، ١٣,٤٧، ٣١,٥٨ طور يرقي معدي/يرقة لنفس المعاملات على التوالي. وبعد ٩٦ ساعة من المعاملة سجلت نسب موت مكتملة لكل المعاملات.

عند خلط *H. bacteriophora* مع *dipel 2X* كانت قيم LC_{90} بعد ٤٨ ساعة من المعاملة كالاتي: ٤٨,٥٤، ١٢٩,٥٧، ٥٨,٥٧ طور يرقي معدي/يرقة وذلك بالمعاملة بالنيماتودا بمفردها وعند خلطها مع *dipel 2x* بالتركيزات ١، ٠,٥٠، ٠,٢٥ جرام/لتر على التوالي. بعد ٩٦ ساعة من المعاملة القيم انخفضت إلى ٤٨,٥٤، ٢٢,٣٢، ٢١,٠٥ طور يرقي معدي/يرقة لنفس المعاملات على التوالي. قيم LC_{90} عند خلط *H.bacteriophora* مع *Delfin* كانت ٧١,٢، ٣٨,٤٩، ٤١,٠٦، ٣٢,٢٧ طور يرقي معدي/يرقة وذلك بالمعاملة بالنيماتودا بمفردها وعند خلطها مع *Dipel 2x* التركيزات ٠,٢٥، ٠,٥٠، ٠,٥٠ جرام/لتر على التوالي. وسجلت نسب الموت مكتملة بعد ساعة من المعاملة. اليرقات التي ما زالت على قيد الحياة من معاملات النيماتودا المنفردة تحولت إلى عذراء طبيعية أما اليرقات التي ما زالت على قيد الحياة وعوملت بالخليط وجد فيها بعض التشوهات بالعذاري.

— التأثير على طور العذاري

عند خلط *H.bacteriophora* ٤٠ طور يرقي معدي/عذراء مع *Dipel 2x K* *Delfin*، بتركيز ١ جم/لتر أدت إلى نسبة موت بالعذاري ١٣,٣٣ % فقط. كل العذاري التي ما زالت على قيد الحياة أنتجت حشرات كاملة طبيعية.

١٠- دراسة بعنوان تقويم بعض المستخلصات النباتية والبكتريا في مكافحة الدودة القارضة (أجروتس ايسيليون) حرشفية الأجنحة للسيدة/ سامية زين سيد جاد الله للحصول علي درجة دكتوراه الفلسفة في العلوم (علم الحشرات) من كلية العلوم جامعة عين شمس عام ٢٠٠١.

تناول البحث دراسة تأثيرات بعض المستخلصات النباتية كمصادر طبيعية ضد حشرة الدودة القارضة التي تعتبر من الآفات الحشرية الخطيرة للعديد من الحاصلات الزراعية.

النباتات التي تم استخلاصها كانت:-

- ١- الفلفل الأسود Piper nigrum
- ٢- الترمس Lupinus termis
- ٣- الزنزلخت Melia azedarach
- ٤- الثوم Allium sativum

كما استهدفت الدراسة إلقاء الضوء عن إمكانية استخدام نوعين من البكتريا كمبيد حيوي في مكافحة الدودة القارضة وهما:

Cry I (A) of Bacillus thuringiensis

Cry I (C) of Bacillus thuringiensis

تأثير المستخلصات النباتية علي موت اليرقات:

أثبتت الدراسة أن مستخلص الفلفل الأسود كان أكثر تأثيراً علي موت اليرقات حيث بلغت قيمة الجرعة النصف مميتة لكل من الفلفل الأسود والترمس. والزنزلخت والثوم هي ٣,٥٨، ٦,٦٩، ٧,٨٦، ١١,٦٨٪ علي التوالي علي العمر اليرقي الأول. بينما كانت للعمر اليرقي الثاني ٤,٤٠، ٧,٣٨، ٨,٥٨، ١٢,٣١٪ علي التوالي بينما كانت الجرعات النصف مميتة للعمر اليرقي الرابع ٧,١١، ١١,٣٥، ١٢,٥٧، ١٨,٥٨٪ علي التوالي. أمكن ترتيب المستخلصات النباتية حسب شدة تأثيرها علي الأطوار اليرقية المستخدمة (العمر الأول والثاني والرابع) كالتالي: الفلفل الأسود < الترمس < الزنزلخت < الثوم (الأقل تأثيراً من المستخلصات الأخرى).

تأثير البكتريا علي موت اليرقات:

وجد من معاملة اليرقات أن العمر الأول كان حساس لنوعي البكتريا المستخدمة بالمقارنة بالعمرين الثاني والرابع. أوضحت النتائج أن البكتريا (C) Cry I أكثر من الـ Cry I (A) حيث وجد أن قيمة الجرعة النصف مميتة (LC_{50}) للبكتريا Cry I (C) لكل من الطور اليرقي الأول والثاني والرابع علي التوالي هي ١,٥٢، ١,٦٥، ٢,٧١ جم/لتر، بينما بلغت قيمة الجرعة النصف مميتة للبكتريا Cry I (A) علي نفس الأطوار اليرقية ٣,٦٣، ٤,٤٤، ٦,٥٣ جم/لتر علي التوالي. كما أظهرت النتائج أن اعلي نسبة موت لليرقات كانت عندما تم تغذية اليرقات علي أوراق الخروج المعاملة بالجرعة النصف مميتة للبكتريا Cry I (C) بينما سجلت أقل نسبة موت كانت عندما تمت المعاملة بالجرعة النصف مميتة للبكتريا Cry I (A).

* تأثير خلط الجرعات النصف مميتة للمستخلصات النباتية المستخدمة والبكتريا علي موت اليرقات:

أظهرت النتائج أن خلط التركيز النصف مميت للمستخلصات النباتية المستخدمة مع الجرعة النصف مميتة للبكتريا Cry I (C) أعطي نسبة موت في اليرقات اعلي من خلطها مع الجرعة النصف مميتة للبكتريا Cry I (A).

كما أوضحت النتائج أيضا أن خلط مستخلص الفلفل الأسود مع كل من نوعي البكتريا Cry I (A) Cry I (C) أعطي اعلي نسبة موت في الأطوار اليرقية الأول والثاني والرابع. بينما أظهرت النتائج أن أقل نسبة موت كانت عند استخدام مستخلص الثوم مع البكتريا Cry I (A). عند تربية العمر اليرقي الأول علي أوراق خروج معاملة بالجرعة النصف مميتة لمستخلص الفلفل الأسود مع البكتريا Cry I (C) كانت نسبة الموت بعد اليوم الثالث والخامس والسابع كالتالي (٥٠,٠، ٧٧,٣، ٩١,٣٪) وللطور اليرقي الثاني كانت النسبة المئوية لموت اليرقات كالتالي (٤١,٠، ٦٤,٦، ٨٣,٣٪) أما بالنسبة للعمر اليرقي الرابع كانت كالتالي (٣٤,٠، ٤٧,٠، ٧٠,٤٪). يتضح من النتائج أن أقل نسبة مئوية لموت اليرقات كانت عند استخدام الجرعة النصف مميتة لمستخلص الثوم وخلطة بالجرعة النصف مميتة للبكتريا Cry I (A) فقد كانت النسبة المئوية لموت اليرقات في العمر الأول والثاني والرابع بعد ٣,٥,٧ أيام كالتالي (٣١,٠، ٤٧,٩، ٥٨,٦، ١٥,٣٢,٥٣٪).

أظهر ترتيب تأثير المستخلصات النباتية علي النسبة المئوية لموت اليرقات بدءا من الأكثر تأثيرا فالأقل كانت كالتالي الفلفل الأسود < الترمس < الزنزلخت <

مستخلص الثوم ولكن عند خلط المستخلصات النباتية مع البكتريا وجد أن مستخلص الزنزلخت أقوى تأثيرا من الترمس.

تأثير الجرعة النصف مميتة لمستخلص الفلفل الأسود والبكتريا Cry I (C) والخلط بينهم علي الخصوبة والإنتاجية للدودة القارضة. لوحظ أن عدد البيض لكل أنثى قد انخفض عند تغذية الطور اليرقي الأول والثاني والرابع بأوراق الخروج المعاملة بالجرعة النصف مميتة لمستخلص الفلفل الأسود والبكتريا Cry I (C). أوضحت النتائج أ، أقل تأثير لوحظ عند معاملة اليرقات بمستخلص الفلفل الأسود بينما كان تأثير البكتريا Cry I (C) أكثر فاعلية منه. ولوحظ أيضا نفس التأثير عند فقس البيض عند المعاملة بالجرعة النصف مميتة للبكتريا أقل من عدد البيض الذي تم فقسه عند المعاملة بمستخلص الفلفل الأسود. عند خلط الجرعة النصف مميتة لمستخلص الفلفل الأسود والبكتريا Cry I (C) فإن عدد البيض لكل أنثى والنسبة المئوية للفقس قد انخفضت بشكل معنوي.

لوحظ أن عدد البيض الناتج من تزاوج (أنثى معاملة X ذكر معاملة) الناتج من تربية الأطوار اليرقية المختلفة علي أوراق الخروج المعاملة بالجرعة النصف مميتة لكل من مستخلص الفلفل الأسود والبكتريا Cry I (C) قد انخفض وأيضا انخفضت النسبة المئوية للفقس انخفاضاً معنوياً. وكان التأثير أقوى عند خلط الجرعة النصف مميتة لكل من المركبين.

لوحظ أن فترة وضع البيض انخفضت عند معاملة اليرقات بالجرعة النصف مميتة لمستخلص الفلفل الأسود من ١٢,٩ يوم لغير المعامل الي ٦,٤ ، ٨,٦ ، ٩,٢ يوم للمعامل للطور اليرقي الأول والثاني والرابع علي التوالي. كما لوحظ أيضا ان استخدام الجرعة النصف مميتة للبكتريا Cry I (C) اثر علي فترة وضع البيض فقد انخفضت الي ٥,٨ ، ٧,٩ يوم للطور اليرقي الأول والثاني والرابع علي التوالي.

أظهرت النتائج انه عند خلط مستخلص الفلفل الأسود مع البكتريا Cry I (C) قد انخفضت فترة وضع البيض انخفاضاً معنوياً الي ٣ يوم للعمر الأول ٣,٢ للعمر الثاني ٧,٤ يوم للطور اليرقي الرابع أما فترة ما قبل وما بعد فترة وضع البيض فقد لوحظ أنها زادت عند معاملة اليرقات بالمركبات المختلفة.

التأثيرات الهستوباثولوجية لمستخلص الفلفل الأسود والبكتريا Cry I(C) والخلط بينهم علي الدودة القارضة:

أظهر الفحص المجهرى للمعى الوسطى للطور اليرقى الرابع أن استخدام الجرعة النصف مميتة لكل من مستخلص الفلفل الأسود والبكتريا (Cry I (C) يؤدي إلى ظهور عدة أعراض هستوباثولوجية أو مرضية مثل تهتك في العضلات والخلايا الطلائية ووجود فجوات كما لوحظ انفصال الغشاء حول الغذائي وكذلك الغشاء القاعدي. تبين من الفحص المجهرى انه عند استخدام خليط الجرعة النصف مميتة لمستخلص الفلفل الأسود مع الجرعة النصف مميتة للبكتريا (Cry I (C) كان أكثر فاعلية على اليرقات عنها منفردة.

١١- "دراسات مقارنة على التأثيرات البيولوجية والسمية لبكتريا باسيللوس ثيورنجنسيسز ومستخلصات نبات النيم على دودة اللوز القرنفلية "السيد أحمد إبراهيم أمام إسماعيل للحصول على درجة الماجستير "حشرات" من كلية العلوم - جامعة عين شمس ٢٠٠١ تحت إشراف أ.د. عادل كمال السيد، أ.د. عبد الرحمن جمال الدين ، د. ليلي سيد على حموده.

تعتبر دودة اللوز القرنفلية من أهم وأخطر الآفات التي تهاجم محاصيل عديدة وخاصة زراعات القطن ومحاصيل العائلة الخبازية الأخرى. ولقد استهدفت هذه الدراسة مقارنة تأثير الجرعات المطبقة من مستحضرات النيمازال التجارية (نيمازال T ٥% أزدرختن ونيمازال F ٥% أزدرختن ونيمازال T/S ١% أزدرختن) والمستحضر التجارى الميكروبي البكتيرى أجرين (المحتوى على ٣٢,٠٠٠ وحدة دولية / ملليجرام والمستخلص من *Bacillus thuringiensis* var. *Egyptii*) على النواحي الحيوية المختلفة لليرقات والعذارى والأطوار البالغة.

تم دراسة تأثير الجرعات تحت المميتة من مستحضرات النيمازال والأجرين على الخواص الحيوية لليرقات والعذارى والفرشات الناتجة وكذا تأثيراتهم المتأخرة (الكامنة) على خصوبة الإناث من ناحية وضع البيض ونسبة الفقس. وقد تم تأكيد هذه النتائج بدراسة التشوهات التشريحية على المعى المتوسط للعمر اليرقى الرابع وعلى أعضاء التناسل (الخصى والمبايض) للذكور والإناث.

ويمكن تلخيص النتائج كما يلي:

أولاً: مستحضرات النيمازال

١-١ التأثير على الطور اليرقى: أدت المعاملة بمستحضرات النيمازال الى موت اليرقات وقد ارتفعت نسبة موت اليرقات بمرور الوقت وبزيادة التركيزات المطبقة الى أن ظهرت أعلى نسب موت فى اليرقات التي تم معاملتها بأعلى الجرعات. وبمقارنة الثلاثة مستحضرات المختبرة كان مستحضر النيمازال T/S هو الأكثر تأثيراً حيث أحدث تركيز ٢٥ جزء فى المليون منه نسبة ١٠٠ % موت لليرقات. وقد لوحظ تأخر موت اليرقات حيث بدأت بنسبة موت بسيطة (يمكن إهمالها) وذلك خلال أول يومين من المعاملة ثم ازدادت تصاعداً بعد ذلك. كما أثرت مستحضرات النيمازال على معدل نمو وتحول اليرقات منتجة بعض

الأشكال اليرقية المشوهة فعند الجرعات العالية استمر عمر اليرقات المعاملة لمدة أسبوعين بعد انسلاخ الطور البالغ في اليرقات الغير معاملة إلى أن ماتت دون أن تتسلخ وقد سميت هذه اليرقات باليرقات الدائمة.

٢-١ التأثير على الطور العذري: تميزت مستحضرات النيمازال بتأثيرها على نسبة موت العذارى، فبالمقارنة بالجرعات المطبقة من النيمازال T و F وجد أن تركيزا صغيرا من النيمازال T/S كان كافيا لتقليل تكون العذارى السيمة. وقد وجد أيضا أن مستحضرات النيمازال قد أثرت على معدل نمو العذارى منتجة اشكالا عذرية مشوهة مثل تكون الأطوار الوسطية بين العذارى واليرقات. وعلى النقيض من اليرقات الدائمة فقد ظهرت هذه الأطوار الوسطية بنسبة كبيرة نسبيا في التركيزات المنخفضة.

٣-١ التأثير على الطور البالغ: أحدثت التركيزات المطبقة من مستحضرات النيمازال على البيئة الصناعية للعمر اليرقي الأول تأثيرا مبطئا لنسبة خروج الفراشات. وقد كان لجرعات النيمازال T/S التأثير الأكبر على خروج الفراشات حيث وصلت نسبة الخروج إلى ٦% عند تركيز ١٥ جزء في المليون وعند تركيز ٢ جزء في المليون وصلت نسبة الفراشات الناتجة إلى ٤% إلا أنها ماتت بمجرد خروجها من العذارى وقد رمز لها بالرمز A. وقد تم تسجيل بعض حالات التشوه أثناء خروج الفراشات من العذارى مثل الفراشات مطوية أو قصيرة الأجنحة ورمز لها بالرمز PA. أمكن بعد ذلك تعيين نسبة الأفراد التي لم تستطيع أن تتحول إلى فراشة بالغة سليمة وقد زادت نسبة هذه الأفراد بزيادة الجرعات المطبقة إلى أن وصلت إلى أعلى نسبة عند أعلى جرعة مطبقة من النيمازال T/S. إسنادا إلى قيم الجرعات النصف قاتلة (LC ٥٠) أمكن ترتيب مستحضرات النيمازال ترتيبا تصاعديا تبعا لفاعلية تأثيرها على أطوار الحشرة المختلفة بداية بالنيمازال F (LC ٥٠ - ٢، ٢٣٢ جزء في المليون) ومرورا بالنيمازال T (LC ٥٠ - ٩، ٤٥ جزء في المليون) ثم النيمازال T/S (LC ٥٠ - ٦٧، ٢ جزء في المليون).

٢- تأثير مستحضرات النيمازال على عمر اليرقات والعذارى والفراشات
أثبتت مستحضرات النيمازال فاعليتها على أطوال أعمار اليرقات والفراشات البالغة تحت مختلف مستويات التركيزات المطبقة في حين لم تختلف أطوال أعمار العذارى الناتجة من المعاملة عن مثيلاتها الغير معاملة. عموما فإنه لوحظ زيادة أطوال أعمار

اليرقات بزيادة التركيزات المطبقة من الثلاثة مستحضرات. وعلى النقيض لم تختلف أطوال أعمار العذارى الناتجة من اليرقات المعاملة عن مثيلاتها في المجموعة الضابطة.

وبملاحظة التأثير على أطوال أعمار الفراشات الإناث (طول عمر الفراشة الأنثى = فترة ما قبل وضع البيض + فترة وضع البيض + فترة ما بعد وضع البيض) وجد أن مستحضرات النيمازال الثلاثة قد أطالت فترة ما قبل وضع البيض. وقد سجلت الجرعات المطبقة من النيمازال T/S أعلى زيادة في فترة ما قبل وضع البيض مقارنة بالزيادة المعتدلة والضعيفة في حالة النيمازال T و F على الترتيب. ومن ناحية فترة وضع البيض وجد أنها كانت أقصر في الإناث الناتجة من المعاملة عنها في المجموعة الضابطة وقد تم تسجيل أقصر فترة وضع بيض في الإناث الناتجة من المعاملة بأعلى جرعة من النيمازال T/S. أيضا تم تسجيل الخفض المعنوي في فترة ما بعد وضع البيض في حالة التركيزات المطبقة من المستحضرين T/S، T فقط وإن كان لجرعات النيمازال T/S التأثير الأعلى على فترة ما بعد وضع البيض. في حين لم تظهر المعاملة بالنيمازال F تأثيرا معنويا على فترة ما بعد وضع البيض إلا عند أعلى جرعه مطبقة.

وحيث أن هذه الفترات الثلاثة تشكل المحصلة النهائية لطول عمر الإناث لذلك فإن التغيير فيها نتيجة المعاملة يعتبر مسئول عن التغيير في طول عمر الأنثى. بزيادة التركيزات المطبقة سجلت مستحضرات النيمازال الثلاثة قصرا معنويا في أطوال أعمار الإناث إلى أن وصلت إلى أقصى قصر عند أعلى جرعة من النيمازال T/S. نفس الاتجاه قد تحقق عند حساب دورة حياة الإناث ولكن على العكس فلم تصل المعاملة بالنيمازال F إلى حد التغيير المعنوي. قد تم أيضا تسجيل القصر المعنوي في أطوال أعمار ذكور الفراشات الناتجة من المعاملة بجرعات المستحضرات الثلاثة وكان لجرعات النيمازال T/S التأثير الأكبر. وبحساب دورة حياة هذه الذكور وجد أن جرعات المستحضرين T و T/S قد حققت قصرا معنويا في حين لم يحقق مستوى القصر في دورة حياة الذكور الناتجة من المعاملة بجرعات النيمازال F التغيير المعنوي إلا في الجرعات العالية.

٣- تأثير مستحضرات النيمازال على الوزن: عند معاملة البيئة الصناعية لليرقة بجرعات النيمازال T، F نتج يرقات وعذارى أقل في الوزن من مثيلاتها الغير معاملة وقد أثبت الانخفاض في معدلات النمو النسبي لليرقات هذه النتائج. وكانت

- أقل اليرقات والعذارى وزنا وكذلك كانت أقل معدلات نمو لليرقات قد سجلت في اليرقات والعذارى الناتجة من المعاملة بجرعات النيمازال T/S.
- ٤- التأثير الطارد للنيمازال T/S: تم تصميم هذه التجربة لإثبات التأثير الطارد للنيمازال T/S على اليرقات في تجربة اختبار حر. فبعد ٣ أيام من المعاملة ازداد توجه اليرقات إلى الجزء الغير معاملة بنسبة أكبر من الجزء المعامل وتسجيل نسب موت اليرقات وجد أن اليرقات قد ماتت في الجزئين عند حواف أطباق بترى معنى ذلك أن موت اليرقات كان أما بسبب التأثير المباشر على اليرقات أو عن طريق التأثير الغير مباشر عن طريق رائحة النيمازال T/S.
- ٥- تأثير رائحة النيمازال T/S: وقد أحدث التعريض لرائحة النيمازال T/S نسب موت لليرقات قدرت ب ٢٤% مقارنة ب ٦% في اليرقات الغير معاملة كما فأنخفضت نسبة الأفراد التي لم تستطيع أن تتحول إلى فراشات بالغة سليمة بمعدل ٢٠%. وقد أثرت رائحة النيمازال أيضا تأثيرا معنويا على فترة ما قبل وضع البيض وفترة وضع البيض كما أحدثت انخفاضا معنويا في قدرة الإناث الناتجة على وضع البيض بينما لم تحدث الرائحة تأثيرا معنويا في نسبة فقس البيض.
- ٦- تأثير مستخلصات النيمازال على وضع وفقس البيض: أثرت الجرعات المختلفة من مستخلصات النيمازال الثلاثة على قدرة الإناث الناتجة من المعاملة في كلا من وضع وفقس البيض. وقد سجلت أعلى جرعة من النيمازال T/S نسبة عجز جنسي كاملة مقارنة بالتأثير المعتدل والضعيف في حالة الإناث الناتجة من المعاملة بمستحضري T و F على الترتيب وبحساب نسبة العجز الجنسي ونسبة الانخفاض في عدد البيض الموضوع وعدد البيض الفاقس أمكن إثبات التأثير الممتد لمستحضرات النيمازال.

الدراسات التشريحية

١- الفحوصات التشريحية للمعدة الأوسط

يمكن تلخيص التشوهات النسيجية في المعى المتوسط لليرقات الناتجة من المعاملة كما يلي: تحطم الغشاء لحول غذائي. تحلل الخلايا الطلائية وظهور فجوات بها وانفصالها عن الغشاء القاعدي.

٢- الفحوصات التشريحية لأعضاء التناسل

- ١-٢- التأثير على الخصية: أوضحت القطاعات الطولية في الخصية الناتجة من المعاملة بعض التشوهات ويمكن تلخيصها فيما يلي: تحلل الحواجز بين قنوات الخصية. تحطم وتحلل الخلايا الجرثومية أثناء المراحل المختلفة لتكون الحيوانات المنوية. تحطم حزم الحيوانات المنوية وانكماش محتويات الخصية.
- ٢-٢- التأثير على المبيض: أوضحت القطاعات الطولية في المبيض الناتج من المعاملة بعض التشوهات ويمكن تلخيصها فيما يلي: تحطم وتحلل البويضات وخلاياها المغذية وظهور فجوات بهما واختفاء الحواجز بينهما. انكماش المخ في البويضات البالغة وتشوه جدارها.

ثانيا: مستحضر الأجرين

- ١-١- التأثير على الطور اليرقي: أظهرت النتائج علاقة طردية بين التركيزات البكتيرية ونسبة موت اليرقات فقد سجلت أعلى نسبة موت عند أعلى تركيز بكتيري مطبق بعد أول ٣ أيام من المعاملة وبمرور الوقت انخفضت نسبة الموت إلى أن انعدمت في اليوم الثامن من المعاملة.
- ١-٢- التأثير على الطور العذري: أظهرت المعاملة بجرعات الأجرين المختلفة انخفاض تدريجي معتدل في نسبة التعذر مقارنة بنسبة تعذر اليرقات الغير معاملة. وقد أظهرت المعاملة تأثير ضعيف على موت العذري فلم تتجاوز نسبة موت العذري ٤% عند تركيز ١٠ جرام/لتر. وعند الجرعات المتوسطة تم تسجيل نسبة من اليرقات التي قد زاد طول عمرها اليومي إلى حوالي ٣٠ يوم وبعد ذلك استطاعت أن تكمل نموها الطبيعي منتجا عذارى صغيرة.
- ١-٣- التأثير على الطور البالغ: أظهرت النتائج علاقة طردية بين التركيزات البكتيرية المطبقة ونسب خروج الفراشات وقد كانت أعلى نسبة عجز في خروج الفراشات قد سجلت عند أعلى تركيز مطبق. وفي النهاية أمكن حساب نسب الفشل في تكوين الأطوار البالغة والتي تغيرت طرديا مع التركيزات المستعملة. بملاحظة التأثير البكتيري على مختلف أطوار دودة اللوز القرنفلية يمكن القول بأن التأثير السام يقتصر على الطور اليرقي أما التأثير على باقي الأطوار فإنه مرضي أكثر منه تأثير سام. استنادا إلى قيم الجرعات النصف قاتلة (LC ٥٠) وجد أن تركيز ٥٣، ٥٨ جم/لتر كان كافية لقتل نصف التعداد المختبر.

٢- تأثير مستخلص الأجرين على العمر اليرقي والعذري والفراشات: استهدفت هذه التجربة دراسة التأثير الممتد لمعاملات البكتيريا على أطوال الأعمار للبرقة والعذراى والأطوار البالغة. أحدثت معاملات العمر الأول بتركيزات الأجرين المختلفة ازديادا طرديا فى طول العمر اليرقي. وقد تم تسجيل التغير المعنوي فى طول العمر اليرقي بداية من التركيز ٥، ٢ جم/لتر بحوالى ٦، ١٥ يوم إلى أن وصلت إلى ٨، ١٦ يوم عند تركيز ٢٠ جم/لتر مقارنة ب ٧، ١٤ يوم فى مثيلاتها الغير معاملة. على النقيض فلم تحدث معاملات الإجرين أى تغيرات معنوية فى أطوال أعمار العذراى الناتجة من البرقات المعاملة.

وبالنسبة للتأثير على أطوال أعمار إناث الفراشات الناتجة فلم تتأثر جميع فتراتھا (فترة ما قبل وضع البيض وفترة وضع البيض وفترة ما بعد وضع البيض) تأثيرا معنويا نتيجة للمعاملة. ففي حين تغيرت فترة ما قبل وضع البيض بالزيادة وفترة وضع البيض بالنقصان وكان التغير معنوي ضعيف فإنه لم تختلف فترة ما بعد وضع البيض عن مثيلاتها فى الحشرة الغير معاملة. وعلى ذلك فإن المحصلة النهائية لطول عمر الإناث قد نقصت تدريجيا إلى أن وصلت إلى النقصان المعنوي عند الجرعات العالية فقط. بالنسبة للتأثير على ذكور الفراشات الناتجة فقد تم تسجيل تغير معنوي طفيف فى أطوال أعمارھا عند الجرعات العالية فقط فى حين لم يصل التغير فى دورة حياتھا إلى حد المعنوية.

٣- تأثير مستخلص الأجرين على الوزن: كان لتركيزات الأجرين المختبرة تأثير معتدل على أوزان البرقات والعذراى وأيضا على معدل نمو البرقات فقد بدأ النقصان المعنوي فى أوزان الطور اليرقي والعذري عند التركيزات الوسطى إلى أن وصل إلى أعلى قيمة له عند أعلى تركيز. وبالنظر إلى معدل نمو البرقات المعاملة وجد أن نسبة من العينات اليرقية قد قل وزنها بشكل واضح وبالذات عند الجرعات العالية وهذه البرقات بعضها مات فى العمر اليرقي والبعض الآخر استطاع أن يكمل نموه ويمكن إرجاع هذا التأثير إلى حساسية البرقات للبكتيريا وسمومھا.

٤- تأثير مستخلص الأجرين على وضع وفقس البيض: أظهرت معاملات العمر اليرقي الأول بالأجرين تأثيرا ممتد على الإناث الناتجة من حيث عدد البيض الموضوع ونسبة فقسه. حيث أوضحت الدراسة وجود علاقة عكسية بين الجرعات الميكروبية المطبقة وعدد البيض الموضوع والفاقس. وقد أمكن إثبات هذه النتائج بتوضيح العلاقة الطردية بين الجرعات المطبقة والنسب المئوية للعجز الجنسي وكذا

العلاقة العكسية بين الجرعات المطبقة وكلا من نسبة العجز في وضع البيض ونسبة
فقس البيض.

الدراسات التشريحية

- ١- الفحوصات التشريحية المعى المتوسط: يمكن تلخيص التشوهات النسيجية في
المعوى المتوسط للسيرقات الناتجة من المعاملة كما يلي: تحطم الغشاء الحول
غذائى، تحلل الخلايا الطلائية وظهور فجوات بها.
- ٢- الفحوصات التشريحية لأعضاء التناسل: أظهرت المعاملة بمستحضر الأجرين
تأثيراً ضعيفاً على كلا من الخصية والمبيض.

١٢- "دراسات توكسيكولوجية على بدائل المبيدات الكيماوية" للسيدة/ جيهان فتحى على محمود للحصول على درجة ماجستير فى كيمياء المبيدات من كلية الزراعة - جامعة الاسكندرية (٢٠٠١) تحت اشراف أ.د. نبيل أحمد متصور ، أ.د. محمود مرشدى فرج ، د. شبل محمد شرابى أستاذة كيمياء المبيدات بالكلية.

تهدف الدراسة إلى استخدام المنهج البحثي العلمي فى تقييم مكافحة الحيوية للحشرات باستخدام بكتريا الباسيلس ثيرونجينسيس كأحد وأهم الوسائل المقترحة الآمنة بئسباً لمكافحة الآفات الحشرية. وقد تم خلال ذلك تقييم عدة تجهيزات من هذه البكتريا ضد بعض الآفات الحشرية التي تهاجم محصولي الذرة الشامية والقطن فى مصر لما لهذين المحصولين من أهمية اقتصادية وكذلك خلط هذه التجهيزات البكتيرية مع تركيزات منخفضة من بعض المبيدات الكيماوية لتحقيق أعلى مستوى من المكافحة دون الأضرار بالأعداء الطبيعية.

خلال هذه الدراسة قمنا بإجراء التجارب المعملية على ثلاث آفات حشرية من رتبة حرشفية الأجنحة هى دودة القصب الكبيرة وحفار ساق الذرة الأوربي ودودة ورق القطن والأخيرة تم مقارنة السلالات المرباة معملياً بتلك المتحصل عليها حقلياً وقد شملت الدراسة النقاط التالية:

أولاً: القدرة الإبادية لتجهيزات مختلفة محتوية على النوع kurstaki ضد يرقات دودة القصب الكبيرة وكذلك يرقات حفار ساق الذرة الأوربي وذلك باختيار عدد ثلاث تجهيزات من بكتريا B.t وهى:

دايبيل ٢ أكس، تيوركس ، ديلفين Dipel 2X, Turex and Delfin ضد يرقات العمر الثالث لكليهما باستخدام طريقة غمر عقل من ساق الذرة فى عمر ٣٠ يوم عند تركيزات مختلفة. وقد سجلت قيم التركيزات النصف مميته LC₅₀ بعد مرور ٤ أيام اختلافاً محسوساً حيث كانت تجهيزه تيوركس أقدر التجهيزات على أحداث السمية يليها دايبيل ٢ إكس بينما الديفلين كانت أقل سمية. وقد دلت النتائج على أن يرقات دودة القصب الكبيرة أكثر حساسية للتجهيزات البكتيرية المستخدمة مقارنة بيرقات حفار ساق الذرة الأوربي.

ثانياً: خلط الدايبيل ٢-إكس مع بعض المبيدات الكيماوية المستخدمة لمكافحة دودة القصب الكبيرة: المبيدات المستخدمة كانت ديازينون ، ميثوميل ، فينفايرات -

وعند معاملة اليرقات في العمر الثالث بقيم التركيزات النصف مميتة ثم معاملة اليرقات بتركيزات مختلفة من المبيدات المختارة لوحظ أن قيم التركيزات النصف مميتة بعد المعاملة بمخلوط السلالة البكتيرية والمبيد انخفضت بدرجة ملحوظة يتضح ذلك عند حساب معامل التنشيط (P.F) حيث بلغت قيم معامل التنشيط ٥، ١٧، ٠٠٤، ١٣، ٠٠٨، ٨ لكل من الديازينون، الفينفايرات ثم الميثوميل على الترتيب.

ثالثا: القدرة الإبادية للتجهيزات المختلفة وكذلك مخلوط الجراثيم/البللورات الفعال المعزول من السلالات الأصلية *hurstaki HDI, kurstaki HD 73 and entomocidus* ضد يرقات العمر الثاني لدودة ورق القطن (مقارنة بين السلالة المعملية والسلالة الحقلية). بقياس معامل التحمل (TV) بين السلالات المختبرة (المعملية والحقلية) فقد أوضحت النتائج أن السلالة الحقلية ربما تقع في نطاق التحمل وأحيانا في نطاق المقاومة الحقيقية في الاستجابة للمجموعات المختلفة من المبيدات الكيماوية وكذا المبيدات الحيوية المختبرة.

رابعا: خلط دايبيل - ٢ إكس والسلالة الأصلية HD-1 مع الكلوربيريفوس، الميثوميل والفينفايرات ضد يرقات العمر الثاني من دودة ورق القطن.

أوضحت النتائج أن قيم التركيزات النصف مميتة للمبيدات انخفضت بدرجة ملحوظة وذلك بعد معاملة الحشرات بالسلالات البكتيرية (قيم النصف مميتة) ثم استخدام تركيزات مختلفة من المبيدات. كما أوضحت نتائج الخلط مع المبيدات وجود فعل تنشيطي لجميع المبيدات خاصة عند استخدام التركيزات المرتفعة منها.

خامسا: التداخل البيوكيميائي للسموم البكتيرية مع بعض الأهداف البيولوجية في الحشرات المستهدفة. تم اختبار تأثير قيم التركيزات النصف مميتة لكل من الدايبيل - ٢ إكس و HD-1 على يرقات العمر الثاني ليرقات دودة ورق القطن وقد اتضح ما يلي:

١- تأثير سموم البكتيريا B.t. على نشاط الإنزيم المحلل لمادة أدينوزين ثلاثي الفوسفات :- أظهرت السلالات البكتيرية المختبرة طبقا لقيم التركيزات النصف مميتة تثبيطا معنويا ملحوظا للنشاط النوعي للإنزيم خلال مراحل تطور اليرقة المختلفة.

٢- تأثير سموم البكتيريا على نشاط إنزيم H^+ , K^+ ATPase :- أظهرت السلالات البكتيرية المختبرة تثبيطا معنويا ملحوظا للنشاط النوعي للإنزيم خلال مراحل تطور العمر اليرقي (العمر الثاني ، الثالث ، الرابع) لدودة ورق القطن.

٣- تأثير سموم البكتيريا على النشاط النوعي لإنزيم Alkaline phosphatase :
أوضحت النتائج أن استخدام الجرعات النصف مميتة لسلالات البكتيريا المختبرة أدت إلى تثبيط ملحوظ لنشاط الإنزيم المحلل لمادة البار - نيتروفينيل فوسفات في الوسط القاعدي والذي قد يعد أحد أهم الإنزيمات المعلمة للغشاء الداخلي المبطن للقناة الهضمية الوسطى ليرقات حرشفية الأجنحة والذي من المحتمل أن يلعب دورا هاما في ميكانيكية فعل هذه السموم البكتيرية، كما أنه من المحتمل أن يعمل كأحد المستقبلات الهامة التي تحدد فعل وشكل السموم البكتيرية المختبرة.

مما سبق يتضح أن موت اليرقات نتيجة المعاملة ببكتيريا B.T. تعد عملية مستدرجة تتضمن سلسلة متتابعة من الأغراض تعتمد على مقدار التركيز المضاف وأنها ترتبط ارتباطا مباشرا بالتأثير على الغشاء الداخلي المبطن للقناة الهضمية مما ينتج عنه التلف العام للقناة الهضمية الوسطى.

الباب السادس

التحديات التي تجابه الانتاج والاستخدامات الخاصة

بالباسيلليس ثورينجينسيز في الدول النامية

فى السنوات الحديثة اجريت محاولات كثيرة ومضنية لايجاد وسائل بديلة لمكافحة الافات والناقلات الحشرية للأمراض التي تصيب الانسان. لقد كانت هذه المجهودات نتاج ظهور العديد من المشاكل في جراء التوسع المفرط في استخدام المبيدات التقليدية مثل: تطور مقاومة مجاميع الحشرات للمبيدات الحشرية، السمية على الثدييات، الاعتبارات البيئية. لقد تزايدت وبسرعة البحوث والتطوير في مجال الوسائل الميكروبية لمكافحة الحشرات خاصة البعوض الناقل لمسببات الملاريا وغيرها منذ اكتشاف الباسيلليس ثورينجينسيز تحت النوع اسرانييلينسنيز (B.T.I) عام ١٩٧٦. لبعض الوقت استخدمت العديد من السلالات من B.T. ضد الافات الحشرية. فى عام ١٩٨٣ تم توثيق اربعة شركات فى امريكا الشمالية وواحدة فى فرنسا تنتج كميات تجارية من بكتريا B.T.I (Service ١٩٨٣). لقد تمت الإشارة الى ان السلالات المختلفة من تحت النوع B.T. ذات مجالات مختلفة فى النشاط الابادى ضد الحشرات (نلماج وآخرون ١٩٩٠). كذلك تحقق هذه السلالات المختلفة فاعلية مختلفة ضد انواع من الحشرات التي تقتلها مثل: تحت النوع كورسناكى (HD-1) فعالة ضد العديد من افات حرشفية الاجنحة ولكنها كانت ضعيفة الفاعلية ضد البعوض وعديمة الفاعلية ضد الذباب الاسود. من جهة اخرى وجد ان تحت النوع اسرانييلينسنيز شديد الفاعلية ضد البعوض والذباب الاسود ولكنة قليل الفاعلية ضد حشرات حرشفية الاجنحة (Barjac ١٩٧٨ أ، ب، ج). النشاط الابادى ضد اليرقات لهذه الكائنات يرتبط بالاجسام البلورية التي يطلق عليها دلتا-اندوتوكسين-الاجسام البلورية تظهر فى الخلايا فى وقت تجرثم الباسيلليس. كل التوكسينات وجدت ذات اوزان جزيئية عالية فى البروتينات وهى تبدو على نفس المظهر بالرغم من اختلاف وزنها الجزيئى ونوع الحشرات التي تقتلها. لقد وجد ان العزلة الفردية قد تنتج اكثر من توكسين واحد كما ان مجال هذه التوكسينات قد تختلف بشكل عريض (Dulmage and Cooperators ١٩٨١). فى بعض الحالات تختلف كذلك الصفات الطبيعية لبلورات البروتين. كما فى البلورات الصغيرة او الهرمية الثنائية (P₂ toxins) للباسيلليس Bt كورسناكى HD-1 او B.T.K. التي وصفت بواسطة Yamamoto and Mcclayhlin (١٩٨١).

أولاً: طرق جديدة بسيطة لإنتاج وتجهيز الباسيلليس ثورينجنسيز في تايلاند

حيث أن تايلاند تقع في منطقة الرياح الآسيوية monsoon وهناك العديد من أنواع البعوض التي تتوالد في تايلاند والكثير منها كناقلات هامة لبعض الأمراض مثل حمى نزيف البرنخ وحمى الدماغ الفيروسية والفلاريا والملاريا. لقد تمت الإشارة إلى أن العديد من أنواع البعوض يطور مقاومة للمبيدات الحشرية (Brown 1986). في الوقت الحالي العديد من الاهتمامات والنواحي البيئية ومشاكلها خلقت وحدثت بسبب الأثر الباقي الطويل للمبيدات والتأثيرات السامة على الكائنات غير المستهدفة بالإضافة إلى تطور المقاومة لعدد من المبيدات الحشرية الكيماوية مما أدى إلى بروز اتجاه البحث عن وسائل بديلة لمكافحة البعوض الناقل لمسببات الأمراض. لقد أوصت هيئة الصحة العالمية WHO باستخدام البكتريا B.T.I. و B. spharricus كوسيلة بديلة لمكافحة الناقلات الحشرية. توجد عدد من المصانع في أمريكا وأوروبا تنتج هذه الوسائل الميكروبية على نطاق تجاري لمكافحة البعوض. تكاليف استيراد هذه المبيدات الحشرية الميكروبية مازالت عالية جداً في الدول النامية مثل تايلاند بسبب بعد مسافة النقل من الدول المنتجة لذلك فإن البحوث والتطوير عن الأماكن المحلية لإنتاج هذه الوسائل الميكروبية يكون أكثر مناسبة وملائمة لهذه الدول. لقد اتضح أن هذين النوعين من البكتريا يسهل تمثيلها في بيئات بسيطة بشرط توفر عمليات إنتاج مناسبة تأخذ في اعتبارها العديد من العوامل المحددة.

مميزات الإنتاج المحلي:

- هناك عدد من المميزات من جراء تشجيع وتحفيز تطوير إمكانيات الإنتاج المحلي للمبيدات الحشرية في الدول النامية. في البداية فإن من أكثر المميزات اهتماماً للإنتاج المحلي ما يتعلق بثبات المنتج النهائي. من أكثر الصعوبات التي تقف عقبة في استخدام المبيدات الميكروبية عدم الثبات وتباين سمية مستحضراتها. عدم الثبات هذا ينتج من طول فترة الشحن مصحوبة بطول وتباين درجات حرارة تخزين قبل وصول المنتج إلى المستهلك. لقد خلص الباحث ورجال مكافحة الحشرات وجعلها خيار مطروح لمكافحة الآفات الحشرية من رتبة حشرية الاجنحة. لذلك فإن عيوب مماثلة قد تحدث في برنامج مكافحة البعوض إذا كانت المبيدات الميكروبية المستخدمة في برنامج مكافحة البعوض تنتج فيما وراء البحار ومن ثم تستورد كي تستخدم في الدول النامية. لتجنب هذه المشاكل يجب تشجيع الإنتاج المحلي.

ايزاواى ، كورستاكى بالمطفرات للحصول على طفرات من جنس لا ينتج الجراثيم ولكنه يظل منتجا للدلتا-اندوكسين (واكيساكا وآخرون ١٩٨٢) التوكسين الناتج يكون مماثل تماما للعزلات الام. ان مسألة تخمر Bt من الامور المشجعة والضرورة اذا كان تخمر البكتريا Bt فى الطريق لتصبح مقبولة ومتاحة عمليا.

- العلاقة بين وجود الاجسام الضمنية وسمية B.sphaericus تجاه يرقات البعوض مازالت مختلفة عن انواع B.t. لقد اتضح ان سمية سلالة B. sphaericus 2297 زادت ارتباطا مع تكوين البلورات الضمنية (كالفون وآخرون ١٩٨٤). لكن بعض من هذه السلالات قد تسبب سمية ضد يرقات البعوض فى غياب الاجسام الضمنية. يمكن الحصول على نمو جيد لبكتريا باسيليس سفيريكس باستخدام طرق الانتاج المستمر وقد اتضح انها تنتج على الاقل ١٥-٢٥% من مستويات البريسبور Prespore levels المنتج النهائى لهذا التحضير اظهر كفاءة ممتازة فى الرش الحقلى الواقعى (هرتلين وآخرون ١٩٨١).

كفاءة تحسين انتاجية B.t. و B. sphaericus

اختيار المواد المغذية:

كما ذكر سابقا فان الاحتياجات العامة للباسيليس من المواد المغذية تختلف من نوع لآخر. فى الدول النامية مثل تايلاند اذا كانت عمليات التخمر اقتصادية يجب ان تؤخذ الاعتبار عن تكلفة المواد المغذية nutrients التى يجب ان تكون رخيصة لذلك فانه من الافضل استخدام المواد المغذية المتوفرة محليا سواء المواد الخام غير المكلفة او منتجات السفايات. لقد تم اقتراح عدد كبير من المواد الفعالة لانتاج Bt (ولماج ، كوربا وكاليجوس - موراليس ١٩٩٠) كما فى جدول (٦-١).

جدول (٦-١): امثلة عن المكونات المحلية لبيئات الباسيلليس والمتوفرة في الدول النامية

- السوائل: لبن جوز الهند - سكر خام - مولاس - سائل الذرة
- نتروجين غير معنوي: كبريتات الامونيوم
- مسود نباتية المصدر: بذور البقوليات وغيرها مثل فول الصويا والقطن ... ، الحبوب مثل الذرة ودقيق القمح ، كربوهيدرات ، دكستريين ، مالتوز ، سكروز ، جلوكوز ، مستخلصات نباتية ودرنات بطاطس ، جذور البطاطس ... الخ ، الكاسافا ، بطاطا ، الياما.
- مواد حيوانية (غير نديبة) المصدر مثل دقيق السمك
- مواد نديبة المصدر مثل الدم وبقايا ذبح الدواجن

بالنسبة لبيئة *B. sphaericus* تركز المجهودات في الانتاج المحلي في البحث عن المواد الخام المتاحة محليا لعمليات التخمير وقد تحققت نجاحات كبيرة في هذا الاتجاه. بعض الامثلة موجودة في جدول (٦-٢) (Bhumiratana ١٩٩٠).

جدول (٦-٢): بعض امثلة المواد الخام التي تستخدم في تجهيز بيئة التخمير للانتاج المحلي للباسيلليس سفيركس B.T.I.

| المواد الخام | ملاحظات ومصدر الدراسات المرجعية |
|---|--|
| * منتجات زراعية: فول البامبرا ، لوبيا ، فول سوداني ، فول الصويا | يتم استخلاص هذه المواد في ماء مغلي ثم تضاف لاساس البيئة التي تحتوى على دم بقرى مجفف واملاح معدنية. (Obeta and Okadior ١٩٨٣). |
| ذرة ودقيق بذرة القطن ، كاسافا ، يامز | Vandekar and Dulmage, 1983 |
| * منتجات حيوانية: دم - عظام - اجزاء دواجن ومخلفات حيوانية | Vandekar and Dulmage, 1983 Hertlein et al., 1981 |
| * نواتج ثانوية صناعية: نواتج من مصنع تحضير المونو صوديوم جلوتامات | Dharmsthiti, Pantuwatana, and Bhumiratana, 1985 |
| * مواد اخرى: لبن جوز الهند ، معجون الذرة مولاس | Vandekar and Dulmage, 1982 |

معظم الدراسات المرجعية استهدفت الحصول على نمو ميكروبي مشابه او اعلى مما يتحصل عليه في البيئات المعملية الروتينية. المواد الخام المستهدفة تشمل منتجات زراعية. يجب ملاحظة ان النواتج الثانوية ذات المحتوى العالي من السكر مثل المولاس

غير مناسبة في مزارع الباسيلليس اسفيريكس لان هذه البكتريا لا تستخدم السكر. في كل التقارير امكن تحقيق محصول على من الخلايا. تجهيز بعض البيئات يتطلب معاملات سابقة مكثفة مثل الاستخلاص او التحلل المائي. على العكس فان تجهيز بيئة الكربوهيدرات التي اقترحت بواسطة Dharmsthiti واخرون (١٩٨٥) حققت وتملك ميزات عديدة:

١. سهولة تجهيز البيئات دون الحاجة لمعاملات مسبقة لاي من المكونات
٢. البيئة تعضد حدوث نمو على وسعية الباسيلليس اسفيريكس.
٣. تكلفة المادة الخام الاساسية للتخمر متناهية الرخص لانها عبارة عن نفايات من صناعة التخمر او نواتج ثانوية في هذه الصناعة.

استخدام البيئة المجهزة من النواتج الثانوية الصناعية قد تنتج في تذبذبات او تغيرات غذائية اعتمادا على جودة المادة الخام من قطفات المصنع. هذه المشكلة يسهل حلها والتغلب عليها من جراء تقدير كمية L-tyrosin في كل تحضير من مواد المصنع (ويطلق عليها HDL) وعمل تخفيف مناسب. فترات اختبار L-tyrosine ليست بالضرورة ان تتكرر كثيرا حيث ان كل تحضير من HDL تنتج بكمية كبيرة ويمكن تخزينها لفترات طويلة ومعقدة. لذلك فان الاختلافات الصغيرة في مختلف تحضيرات المصنع لن تخلق صعوبات او مشاكل في عملية التخمر حتى مع التوسع فيها.

التخمر Fermentation:

- تخمر السلالات المختلفة من B. sphaericus, B.t. بصرف النظر عن تحت النوع لها مواصفات عامة شائعة. كما ذكر اعلاه فان لها متطلبات غذائية متشابهة ولو ان السلالات كل على حدة لها تعريف مميز كما ان البيئة التي تعضد النمو الجيد او انتاج التوكسين في سلالة ما قد لا تناسب سلالة اخرى (دلماج ١٩٧٠ ، ١٩٧١ - سلامة واخرون ١٩٨٣ أ ، ب - سلامة وفودة ١٩٨٣ و سميت ١٩٨٢). بناء على البيانات المتاحة فيما يتعلق بالمواد الخام لانتاج B.sphaericus B.T. فقد امكن الاستنتاج ان البدائل المناسبة والمتوفرة لبيئة المعمل يمكن ان تجهز بسهولة. لذلك فان توفر مادة خام رخيصة لا تمثل عقبة كبيرة في محاولات الانتاج المحلي للبكتريا. القوة الدافعة لتحضير قدرات الانتاج المحلي ليست في جعل المنتج متوفرا خلال فترة قصيرة نسبيا فقط ولكن تقليل نفقات النقل كذلك زيادة فترة الثبات وتقليل

التكاليف مما يجعل المادة المنتجة محليا قادرة على المنافسة في الجودة والسعر مع المنتج المستورد.

- حيث ان تكلفة المخمر كبير الحجم عالية جدا على قدرات الدول النامية فان الامكانيات المتوفرة في الوقت الراهن في المعمل ذات سعات ٢٠٠ لتر. لذلك فان دراسة امكانية تطوير نظم تخمر عالية الكفاءة للانتاج المحلى لبكتريا B. sphaericus, B.t.i. اتبع لانتاج محصول خلايا كبير عما هو الحال مع النظام التقليدى للتخمر المغمور. التجارب المبكرة عن انتاج B.t.i. استخدمت نظم تخمر تغذية القطعة Fedbatch و الفصل بالاغشية dialysis. من احد المشاكل التي تحدث بسهولة هو تلوث النظم خاصة تلك المتعلقة بالفصل الغشائى. المشكلة في التلوث انها سوف تتفاقم مع محاولات زيادة سعة وقدرات الانتاج. لذلك صممت التجارب في محاولة لاجراء تدوير للخلايا مع نظام الغشاء المرتبط في انتاج B.t.i. و b. سفيريكس. لقد فقد النظام ببنمية البكتريا في مخمر تقليدى. بعد ٢٤ ساعة من فترة التخمر تم تجهيز اربعة لتر من المزارع خلال غشاء المليونير المتقب (حجم المسام ٠,٤٥ ميكرون) في وحدة الترشيح. ثم استبعاد الراشح ثم يعاد تدوير الخلايا مرة اخرى في المخمر. بعد ذلك تم اضافة ٤ لتر من البيئة الطازجة المعقمة من نفس التركيب الى المخمر للحصول على نفس الحجم الاصلى ٦ لتر. يتم تكرار دورات تدوير الخلية بنفس الاسلوب بعد ٢٤ ، ٤٨ ، ٧٢ ، ٩٦ ، ١٢٠ ساعة وصلت تخمير. البيانات الموجودة في جدول (٦-٣) توضح انه بعد فترة تشغيل النظم دورات او ١٢٠ ساعة اعداد الخلايا الخضرية والجراثيم الى 10×10^3 خلية / مليلتر ، $10 \times 5,9$ جراثيم/مليلتر على التوالي. اذا قام البعض باستخدام هذه البيانات في حساب الانتاجية بناء على محصول الخلايا و/او الجراثيم في اليوم يظهر بوضوح ان الانتاجية باستخدام نظام اعادة تدوير الخلايا اعلى كثيرا من نظام التخمر المغمور ذو القطعة التقليدى.

جدول (٦-٣): انتاج B.t.i. باستخدام نظام اعادة تدوير الخلايا

| الدورة | الوقت (ساعة) | الحجم (لتر) | عامل التركيز | عدد الخلايا الحية | عدد الجراثيم |
|--------|-----------------|----------------|-----------------|----------------------|----------------------|
| 1 | 24 | 6 | none | - | - |
| | 24 | 2 | 3 X | 2.8×10^{11} | 2.3×10^9 |
| 2 | 48 | 6 | None | - | 1.6×10^{10} |
| | 48 | 2 | 3 X | - | 7.5×10^{10} |
| 3 | 72 | 6 | None | - | - |
| | 72 | 2 | 3 X | 7.0×10^{11} | 4.9×10^{10} |
| 4 | 96 | 6 | None | - | - |
| | 96 | 2 | 3 X | 2.1×10^{12} | 7.0×10^9 |
| 5 | 120 | 6 | None | - | - |
| | 120 | 2 | 3 X | 1.0×10^{13} | 5.9×10^{11} |

- امكن الحصول على نتائج متشابهة عندما استخدمت بكتريا *B. sphaericus* (جدول ٦-٤). بالرغم من ان الانتاجية المحصولية كانت منخفضة عنه في حالة بكتريا B.T.I. . هذا قد يرجع الى الاختلاف في حجم ومسارات التمثيل بين هذين الكائنين. علاوة على ذلك فان الباسيلليس سفيريكس كانت اكثر حركة في البيئة بالمقارنة ببكتريا B.T.I. اعداد الخلايا الخضرية والجراثيم زادت بالتوازي مع الكفاءة على يرقات البعوض.

جدول (٦-٤): انتاج بكتريا باسيلليس سفيريكس باستخدام نظام المادة تدوير الخلايا

| الدورة | الوقت (ساعة) | الحجم (لتر) | عامل التركيز | عدد الخلايا الحية | LC50 cuf/ml vs. Cx-quin* |
|--------|-----------------|----------------|--------------|----------------------|-----------------------------|
| 1 | 24 | 6 | none | 2.9×10^7 | 1.2×10^3 |
| | 24 | 2 | 3 X | 7.0×10^7 | 4.2×10^3 |
| 2 | 48 | 6 | None | 4.0×10^7 | 2.8×10^4 |
| | 48 | 2 | 3 X | 7.5×10^9 | 1.2×10^4 |
| 3 | 72 | 6 | None | 7.0×10^7 | 1.9×10^3 |
| | 72 | 2 | 3 X | 1.0×10^8 | 3.9×10^2 |
| 4 | 96 | 6 | None | 7.8×10^8 | 1.6×10^3 |
| | 96 | 2 | 3 X | 1.2×10^9 | 1.6×10^2 |
| 5 | 120 | 6 | None | 9.4×10^8 | 1.7×10^3 |
| | 120 | 2 | 3 X | 2.3×10^9 | 4.4×10^3 |

*cfu = colony forming unit; Cx. Quin = *Culex quinquefasciatus*

لقد استخدمت نواتج التحلل الثانوية في مصانع المونو صوديوم جلوتامات -L- lysine, بفجاح في انتاج بكتريا B.t.i. و B. سفيركس مع تحويلات بسيطة في المكونات. شملت التحويلات تعديل الحموضة على ٧,٥ مع ٠,٠٥ % k_2HPO_4 (فوسفات البوتاسيوم احصاى الابدوجين). البيئة التى طورت لزراعة B.t.i. كانت تتكون من ٤% ناتج ثانوى متحلل عطرى من مصنع المونو صوديوم جلوتامات بينما استخدام ٧% من هذا السائل لزراعة B. sphaericus فى حالة B. سفيركس ثم اضافة مستخلص الخميرة بكمية تجعل التركيز النهائى يصل الى ٠,٠٥%. استخدام نظام اعادة تدوير الخلايا اثبت افضلية عن نظام تغذية التحضير Fed batch او نظم الفصل الغشائى. افضل نظام اعادة تدوير الخلايا تعتمد على حقيقة ان محصول الخلية وكذلك انتاجية النظام كان عاليا ولم تكن هناك مشاكل من التلوث بعد العديد من الدورات المتكررة كما كان النظام تحت السيطرة مع سهولة التحكم فى مدخلات ومخرجاته. اوضحت التجارب الاولى على مخمر سعة ٥٠ لتر ان المحصول الذى تحصل عليه باستخدام نظام اعادة تدوير الخلايا كان فعالا بنفس القدر مع المخمر بسعة ٥ لتر. اتضح ان استخدام نظام اعادة تدوير الخلايا يصلح للتطبيق مع الانتاج المحلى للبكتريا B. sphaericus B.t.i. على المستوى الصناعى. مازالت هناك حاجة لمزيد من التطوير.

المستحضر Formulation:

حيث ان الانواع المختلفة من الكائنات المستهدفة ذات سلوك واماكن معيشة مختلفة فانه تكون هناك حاجة لمستحضرات مناسبة تتلاءم مع خصائص وصفات هذه الكائنات والمواقع. لقد تم تطوير مستحضرات عديدة وتقييمها ضد بعوض الانوفيلس ويرس والكيوليكس بانواعه المختلفة فى المعمل والظروف الحقلية. لقد اتضح ان مستحضر القوالب الطافى يعطى فعالية جيدة على سطح الماء لفترة تصل الى ٢١ يوم او اطول. الصورة المحببة تعطى نشاط جيد فى مناطق الخضرة الكثيفة لانها تنتشر وتخترق سطح الماء بشكل جيد وملئم. لقد وجد ان الاثر الباقي الفعال للمركب المنفرد من الحبيبات على سطح الماء يدوم ٦ ايام تحت الظروف الحقلية بسبب معدل الغرق الى القاع. المادة الحاملة التى تستخدم فى هذين المستحضرين كانت قشور جوز الهند المطحونة وقوالح الفرة المطحونة والتى جففت تماما. مادة الربط لعمل القوالب هناك كانت من صمغ شجرة المطاط. كان جرى خلط المادة الحاملة والصمغ بمعدل ٣:٢ وتضغط على ضغط ٥٠٠٠

رطل/مساحة السطح باستخدام الضغط الهيدروليكي. وبعد تجفيف القوالب كانت تغمس في معلق بيئة مزرعة البكتريا المتحصل عليها من المخمر ثم تجفف على درجة حرارة الغرفة. كانت تجرى دراسات متقدمة لتحديد الظروف المناسبة لإنتاج منتجات عالية الفعالية.

القياسية Standardization:

في الوقت الراهن يكون من الصعب جدا التعبير عن الدلتا-اندوتوكسين في المستحضر على اساس وزن التوكسين بسبب انه لا يوجد تحليل كيميائي مباشر للدلتا-اندوتوكسين. تنقية الدلتا-اندوتوكسين بحيث يكون خالي من الجراثيم من الامور الصعبة جدا، لذلك فان قياس كفاءة المادة التي تحتوى على التوكسين والتعبير عن الفاعلية بوحدة الفعل الالابدى المشتقة من مقارنة فعالية العينة بالمقارنة بالمستحضر القياسى يعتبر السبيل والهدف. عندئذ يعبر عن الكفاءة بالوحدات الدولية (IU) International units في حالة مستحضرات تحت النوع كورس تاكى او بوحدة السمية الدولية (ITU) او International toxicity units في حالة مستحضرات تحت النوع اسر ايلينسيز (H-14). يجب اخذ تجانس الانتاج والمنتج في الاعتبار.

REFERENCES

Barjac, H. de. (1987a). A new candidate for biological control of mosquitoes: *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *Entomophaga*, 23, 209-219.

Barjac, H. de. (1987b). Toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* for larvae of *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi*. *C.R. Acad, Sci. (Paris)*, 286 D, 1175-1178.

Barjac, H. de. (1987c). Une nouvelle variete de *Bacillus thuringiensis* tris toxique pour les moustiques : *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* serotype, 14. *C.R. Acad. Sci. (Paris)*. 286 D, 797-800.

Bhumiratana, A. (1990). Local production of *Bacillus sphaericus*. Ch. 17 in "Bacterial Control of Mosquitoes and Black flies :Biochemistry, Genetics and Applications of *Bacillus thuringiensis israelensis*" ed. By H. de Barjac and D.J. Sutherland. Rutger University Press, New Brunswick., 272-283.

Brown, A.W.A. (1986). Insecticide resistance in mosquitoes :a progmatic review. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, 2, 123-140.

Dharmstithi, S.C. ; Pantuwatana, s. and Bhumiratana, A. (1985). Production of *Bacillus thuringiensis* subsp. *Israelensis* and *Bacillus sphaericus* 1593 on medis using a by-product from a monosodium glutamate factory. *J. Invertebr. Pathol.*, 46, 231-238.

Dulmage, H. T. (1970). Production of the spore-endotoxin complex by variants of *Bacillus thuringiensis* in two fermentation media. *J. Invertebr. Pathol.*, 16, 385-389.

Dulmage, H. T. (1971). Production of delta-endoxin by eighteen isolates of *Bacillus thuringiensis*, serotype 3, in 3 fermentation media. *J. Invertebr. Pathol.*, 18, 353- 358.

Dulmage, H.T. and Barjav, H., de. (1973). HD-187 : A new isolate of *Bacillus thuringiensis* that produces high yields of delta-endotoxin. *J. Invertebr. Pathol.*, 22, 273-277.

Dulmage, H. T. et al. (1981). Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* and their potential for pest control. In "Microbial

Control of pests and plant diseases, 1970-1980." Ed. H.D. Burges, Academic Press : London., 191-220.

Dulmage, H.T. ; Correa, J.A. and Gallegos Morales, G. (1990). Potential for improved formulations of *Bacillus thuringiensis* through standardization and fermentation Development. Ch. 8 in "Bacterial Control of Mosquitoes and Black flies : Biochemistry, Genetics and Applications of *Bacillus thuringiensis israelensis*" ed. By H. de Barjac and D.J. Sutherland. Rutger University Press, New Brunswick., 110-113.

Hertlein, B. C. ; Hornby, J. ; Levy, R. and Miller, T. W., Jr. (1981). Prospects of spore-forming bacteria for vector control with special emphasis on their local production potential. Dev. Industr. Microbiol., 22, 53-60.

Kalfon, A. ; Larget-Thiery, I. ; Charles, J. F. and Barjac, H., de (1983). Growth, sporulation and laticidal activity of *Bacillus sphaericus* Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 18, 168-173.

Kalfon, A. ; Charles, J. F. ; Bourgouin, C. and Barjac, H., de. (1984). Sporulation of *Bacillus sphaericus* 2297 : An electron microscope study of crystal-like inclusion biogenesis and toxicity to mosquito larvae. J. Gen. Microbiol., 130, 893-900.

Massie, J. ; Roberts, G. and White, P. J. (1985). Selective isolation of *Bacillus sphaericus* from the soil by use of acetate as the only major source of carbon. Appl. Environ. Microbiol., 49, 1478-1481.

Niishiitsutsuji-Uwo, J. ; Wakisaka, K. and Eda, M. (1975). Sporeless mutants of *Bacillus thuringiensis*. J. Invertebr. Pathol., 25, 355-361.

Salama, H.S. ; Foda, M.S. ; El-Sharaby, A. and Selim, M.H. (1983a). A novel approach for whey recycling in production of bacterial insecticides. Entomophaga. 28, 151-160.

Salama, H.S. ; Foda, M.S. ; Selim, M.H. and El-Sharaby, A.M. (1983b). Utilization of fodder yeast and agro-industrial by-

products in production of spores and biologically-active endotoxins from *Bacillus thuringiensis*. Zbl. Microbiol., 138, 553-563.

Salama, H.S. ; Foda, M.S. and Dulmage, H.T. (1983). Novel fermentation media for production of delta-endotoxins from *Bacillus thuringiensis*. J. Invertebr. Pathol., 41, -19.

Service, M. W. (1983). Biological Control of Mosquitoes-has it future? Mosquito News. 43 : 113-120.

Smith, R.A. (1982). Effect of strain and medium variation on mosquito toxin production by *Bacillus thuringiensis* var. israelensis. Can. J. Microbiol., 28, 1089-1092.

Wakisaka, Y. ; Masaki, E. ; Koizumi, Y. ; Endo, Y. ; Nishimura, M.S. and Nishiitsuji-Uwo, J. (1982). Asporogenous *Bacillus thuringiensis* mutant producing high yields of delta-endotoxin. Appl. Environ. Microbiol., 43, 1498-1500.

Wakisaka, Y. ; Masahi, E. and Nishimoto, Y. (1982). Formation of crystalline delta-endotoxin or poly-B-hydroxybutyric acid granules by asporogenous mutants of *Bacillus thuringiensis*. Appl. Environ. Microbiol., 43, 1473-1480.

Yamamoto, T. and Mclaughlin, R. E. (1981). Isolation of protein from the parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* toxic to the mosquito larvae, *Aedes taeniorhynchus*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 103, 414-521.

Yousten, A.A. ; Wallis, D.A. and Singer, S. 1984. Effect of oxygen on growth, sporulation, and mosquito larval toxin formation by *Bacillus sphaericus* 1593. Curr. Microbiol., 11, 175-178.

Yousten, A.A. ; Madehekar, N. and Wallis, D. (1984). Fermentation conditions and Bacilowth sporulation, and mosquito larval toxin formation by *Bacillus aphaericus*. Dev. Industr. Microbiol., 25, 757-762.

Yousten, A.A. ; Fretz, S.B. and Jelley, S.A. (1985). Selective medium for mosquito pathogenic strains of *Bacillus sphaericus*. Appl. Environ. Microbiol., 49, 1532-1533.

تانيا: تطوير عملية انتاج عالى للمبيدات الحيوية بواسطة الباسيليليس ثورينجيسيز.

يوجد سببين او عاملين اساسيين يتحديا الاستخدام الواسع للباسيليليس ثورينجيسيز B.t. فى الدول النامية الا وهما: المناورة manipulation والسعر. العامل الاول يتطلب اناس مدربين نوى خبرة ومعرفة عن بيولوجية الافة وكذلك استراتيجيات معروفة جيدا فى برنامج المكافحة المتكاملة للافات وسبل ادارتها بينما العامل الثانى تتمثل فى اجراء البحوث لتقليل تكاليف عملية انتاج B. t. هذا ولو ان استخدامات بكتريا Bt سوف تتعاضم وتزداد فى المستقبل القريب بسبب الضغوط الشديدة من قبل رجالات البيئة واتفاقيات تحرير التجارة العالمية وزيادة مشاكل تطور ظاهرة مقاومة الافات لفعل المبيدات التقليدية. فى اتجاه الانتاج على المستوى التجارى للمبيدات الحشرية من بكتريا Bt ثم تطوير تكنولوجيا تخمر مغمور بالرغم من ندرة توفر ايه معلومات عامة لدى الناس حتى صدور اول حقوق ملكية لهذه التكنولوجيا. من جهة اخرى تم اجراء قليل من الجهد فى اتجاه تنقية المواد الوسيطة وظروف التخمر بهدف زيادة المحصولية بالاضافة الى قليل من الدراسات لتحليل جدوى العملية (Rowe and Margaritis 1987). لذلك استهدف هذا البحث دراسة ظروف الوسائط والتخمر بما يحقق زيادة المحصول الناتج والفاعلية ووضع خطوات عملية التصنيع ومعايير توسيع مدى الانتاج.

مواد وطرق الدراسة:

بداية تم الحصول على سلالة Bt كورستاكي HD-73 من معمل بحوث القطن فى براونفيل وتكساس. السلالة كانت فى حضانة على اجار مغذى مائل. بيئة المزرعة (قطعة ومزرعة مستمرة) كانت تحجز تبعا لوصف Urguijo 1987. بالنسبة لتجارب القطعة المغذاه Fed batch استخدمت بيئة مركزة خمسة مرات. العدوى لوحداث التخمر كانت تنمو فى ورق معيارى وتحضن لمدة 7 ساعات على درجة حرارة 30°م. استخدمت عدوى 2% (حجم/حجم). اجرى التخمر على درجة حرارة 30°م ودرجة حموضة 7 وانهى التخمر عندما تم تجرثم اكثر من 90% من الخلايا. استخدم فى المعمل وحدة تخمر سعة 14 لتر نموذج CFS-314. لقد كان المخمر ذات قطر 80,1 سنتيمتر ومفاعل قلاب HLD = 1,87 وحجم شغل 7000 لتر. لقد اجرى تنفيذ تجارب القطعة المغذاه فى مخمر سعة 14 لتر مع انسياب ابتدائى 1 لتر/ساعة ومعدل انسياب متغير 1 لتر/ساعة. بالنسبة لمعدل نقل الاكسجين و KLa اتبعت الطريقة المتوازنة التى وصفت بواسطة Murkopadhyay and Ghose (1976). بالنسبة لاختبار الطرد المركزى استخدم

جهاز الطرد المركزي وتسييفا لايا نموذج SA 1-02-1752 مع مساحة مكافئة ١٣٨٢ م^٢. بالنسبة لاختبار الترشيح استخدم اختبار ورق الترشيح ايمكو مع سطح ترشيح او قدم^٢. بالنسبة لطريقة التحليل تم تقدير الكتلة الحيوية للبكتريا عن طريق عدد الكلى للخلايا ومضاعفاتها بواسطة وحدة وزن الخلايا (١٠×٢,٥^{١٢} جم/خلية). ثم تحليل الجلوكوز بطريقة DNS (Miller ١٩٥٩). ثم عد الجراثيم في حجرة Neubauer. محصول الكتلة الحيوية كان يعتمد على استهلاك الجلوكوز.

النتائج والمناقشة:

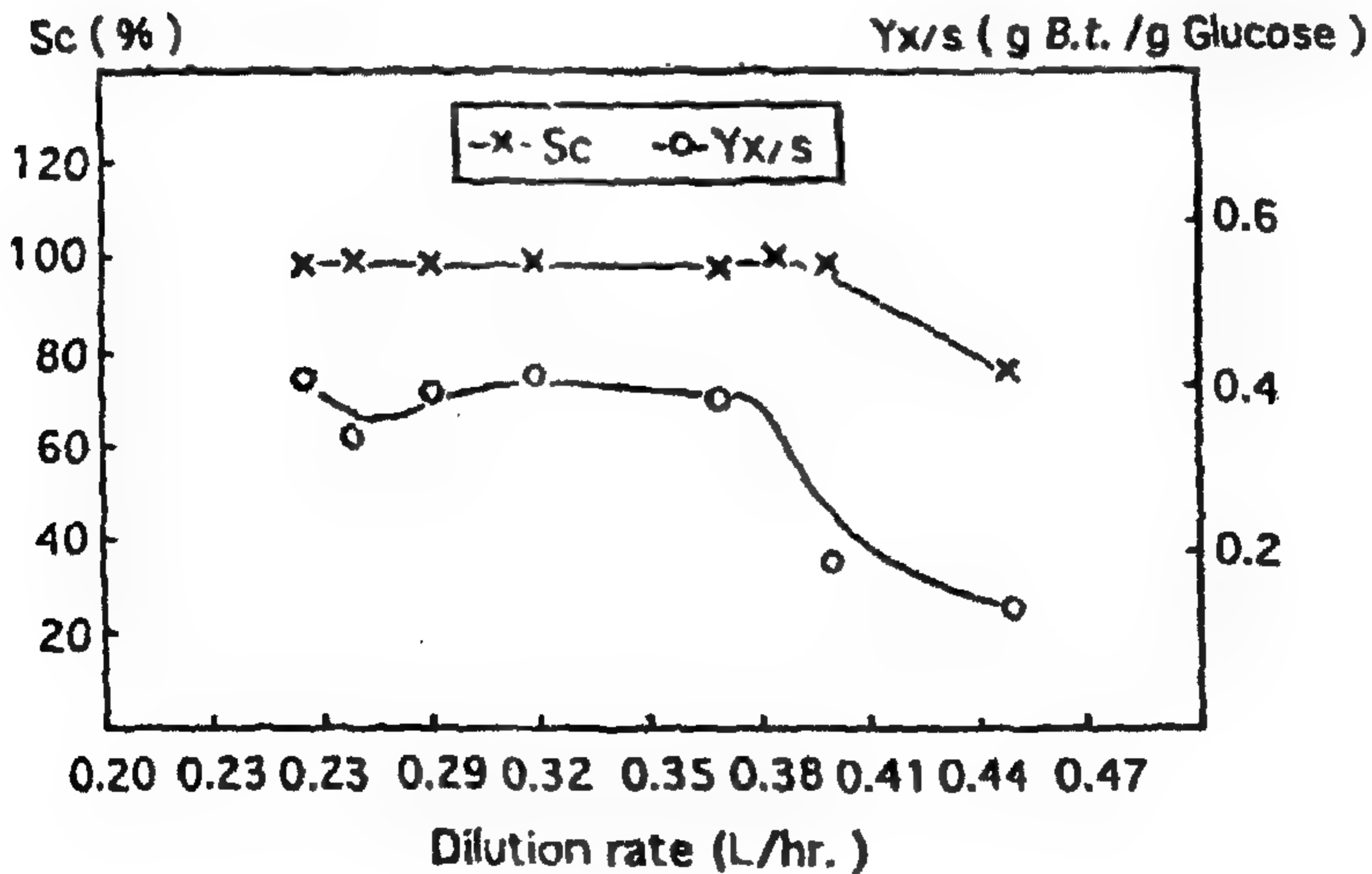
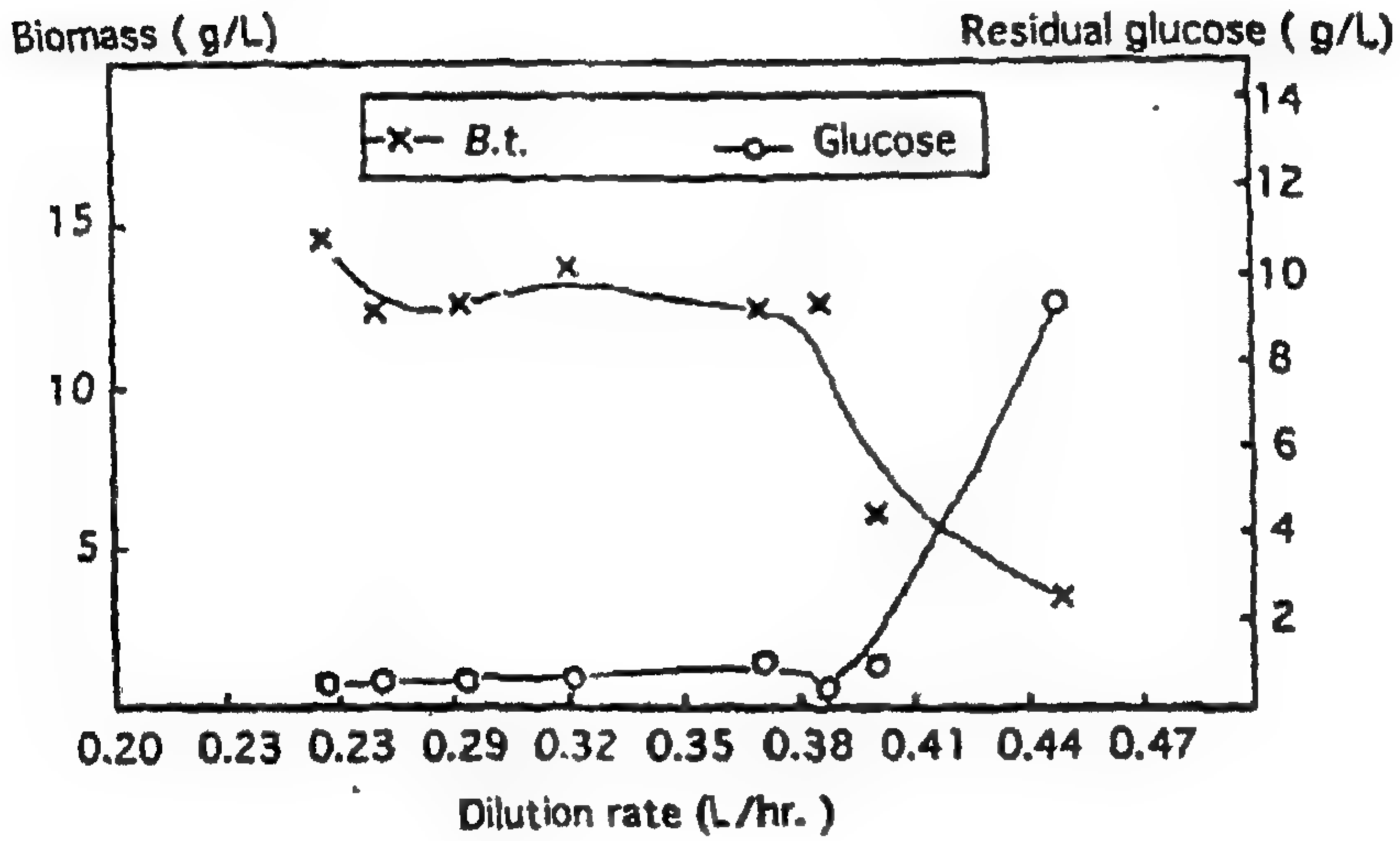
اجريت الدراسات في البداية على موائمة بيئة المزرعة وظروفها. لقد كان الهدف الاساسي استخدام مصدر بروتين رخيص (de urquijio ١٩٨٧). لقد كان في الامكان الوصول الى تركيز خلوي ١٣,٤ جم/لتر مع ٩٠% تجرثم ووقت كامل كلى للتخمير ٢٥ ساعة. وجد معدل البلورات/الجراثيم ١:١ والمنتج (المواد الصلبة الباقية من الخميرة وبقايا الخلايا والبلورات والخلايا) كان ذات سمية $CL_{50} = ١٦٦$ ميكروجرام/سم^٢ ضد حشرة ماندوكا سيكستا (Razo ١٩٩١).

المزرعة المستمرة:

لكي نحصل على معايير الجودة والانتاجية للباسيليس B.t. النامية على الجلوكوز ثم اجراء تجارب الفروع المستمرة. الرسم X-D اوضح ان B.t. ذات حالات تمثيلية مختلفة لمعدلات تخفيف (D) من او وحتى ٠,٥٩^١h ، عند تخفيف $D = ٠,٢$ H^١ كانت هناك خلايا وخلايا متجرثمة وجراثيم حرة (Rodriguez ١٩٩١). لقد نشرت نتائج متشابهة سابقة للباسيليس سبتيليس (Dawes and Thorley ١٩٧٠). للحصول على حركة الخلايا الخضرية النامية على الجلوكوز تم اختيار فترات (D) ٠,٢٥ وحتى ٠,٤٥^١h (الشكل ٦-١). بيانات محصول الكتلة الحيوية الموجودة في المراجع شديدة القياسية وحتى تقارير البحوث اشارت الى فترات عريضة حيث كانت هناك قيم اعلى واقل من ٠,٥. القيم متناهية الارتفاع توضح ان B.t. تستخدم مصدر كربون اخر بالاضافة الى الجلوكوز بينما القيم القليلة تقترح تراكم بعض منتجات التمثيل. Rowe ١٩٩٠ وجد ان B.t. يراكم البيروفات والبيواتيرات والكتات والاسيتات والبولى بيتا هيدروكسى بيوتيرات تحت مختلف ظروف التربية. اكثر من ذلك فانه قادرة على تمثيلها كما هو الحال مع الاحماض الامينية. لذلك فانه من الممكن حدوث الاختلاف الكبير في Yx/s ومعدلات النمو الخاصة المرتبطة باستخدام المواد الوسيطة المنظمة المختلفة وتراكم نواتج التمثيل. هذا بالرغم من

ان معظم دراسات التربية للباسبيليس B.t. لا تأخذ في الحسبان تراكم نواتج التمثيل او استهلاك مصادر الكربون المختلفة.

ففي الدراسات التي اجراها كاتبو هذه المقالة وجد ان $Y_{x/s}$ للجلوكوز تختلف في وظيفة معدل التخفيف ولكن لاختيار الفترة او للفترة المختارة تكون ثابتة وقوية من 0.05. الاكسجين الحقيقي الناتج (Y_{O_2}) كانت 0.73 جم خلية/جرام اكسجين والطاقة المصانة كانت 0.065 جرام جلوكوز /جم خلية / ساعة.



شكل (٦-١): رسم X-D للباسبيليس ثوريينجنسيز

جدول (٦-٥): معايير الحركة للباسيلليس ثورينجنسيس

| المصدر | k_s (mg/ml) | μ_{max} (1/h) | $Y_{x/s}$ | Variety الصفة |
|---------------|------------------|----------------------|-------------------|-----------------------|
| Anderson | - | 0.6-1.1 | 0.56-1.98 | Kurstaki 1990 |
| Arcas 1987 | - | 0.47-0.77 | 0.30-0.52 | Kurstaki |
| Goldberg 1980 | - | 0.29-0.83 | - | Berliner |
| Holmberg 1980 | 1.8.2.0 | 0.70-1.90 | - | Thuringiensis |
| Rowe 1990 | - | 0.48-0.51 | 0.60-0.67 | Kurstaki |
| This work | - | 0.60-0.78 | 0.32-0.41 | Kurstaki |
| This work | 0.48 | 1.21 | ^b 0.43 | ^a kurstaki |

^a continuous culture – ^b true yield for glucose

مزرعة القطفة المغذاه Fed Batch Culture :

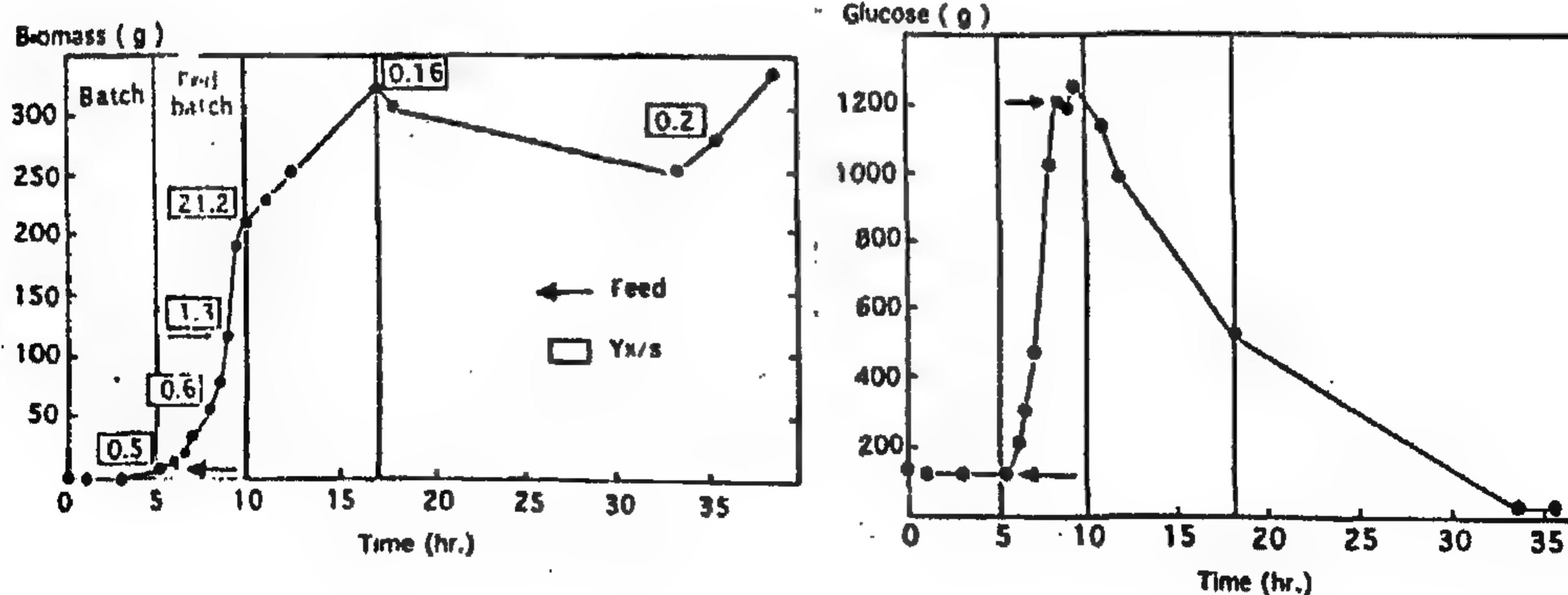
معايير الحركة للبكتريا B.t. النامية على الجلوكوز قد استخدمت لمضاهاة القطفة المغذاه لكي نحصل على افضل ظروف التغذية (معدل الانسياب وتركيز المواد المغذاه) للحصول على اقصى انتاجية للكتلة الحيوية تبعا لنظام التخمر. لقد تم اختيار الانسياب الخطى والنتائج التى اسفرت عنها الدراسة موجودة فى الشكل (٦-٢). خلال مزرعة القطفة لم يستهلك الجلوكوز ولكنه تراكم خلال مرحلة التغذية ومن ثم افترض ان البكتريا تمثل مادة وسيطة اخرى قد تكون الاحماض الامينية والبيوتيريات. النمو الاساسى قد تبعة النمو الخطى وخلال هذه المرحلة الاخيرة كان الجلوكوز تميل انه لا يستهلك فى نهاية مرحلة النمو. لذلك حدثت اطالة لمرحلة التجريثم وقد اوضحت الدراسات المبكرة ان الجلوكوز المتبقى كان له هذا التأثير (de ureguijo ١٩٨٧). لقد اجريت تجارب اخرى عن القطفة المغذاه مع استبعاد الجلوكوز من التغذية والنتائج مدونة فى الجدول (٦-٦). فى كل الحالات كان التخمر ينتهى عندما تجريثم اكثر من ٩٠% من الخلايا. فى مزرعة القطفة المغذاه وبدون جلوكوز التغذية ثم الحصول على ٢,٧ x ١٠^{١٠} جراثيم/مليلتر فى ٢٣,٥ ساعة. هذه النتائج مشابهة لتلك التى اعلنت بواسطة Areas وآخرون (١٩٨٧). سمية المنتج ضد ماندوكا سيكستا كانت مخالفة لمنتج القطفة.

جدول (٦-٦): مقارنة بين مزارع بكتريا Bt بطريقة batch والقطفة المغذاة.

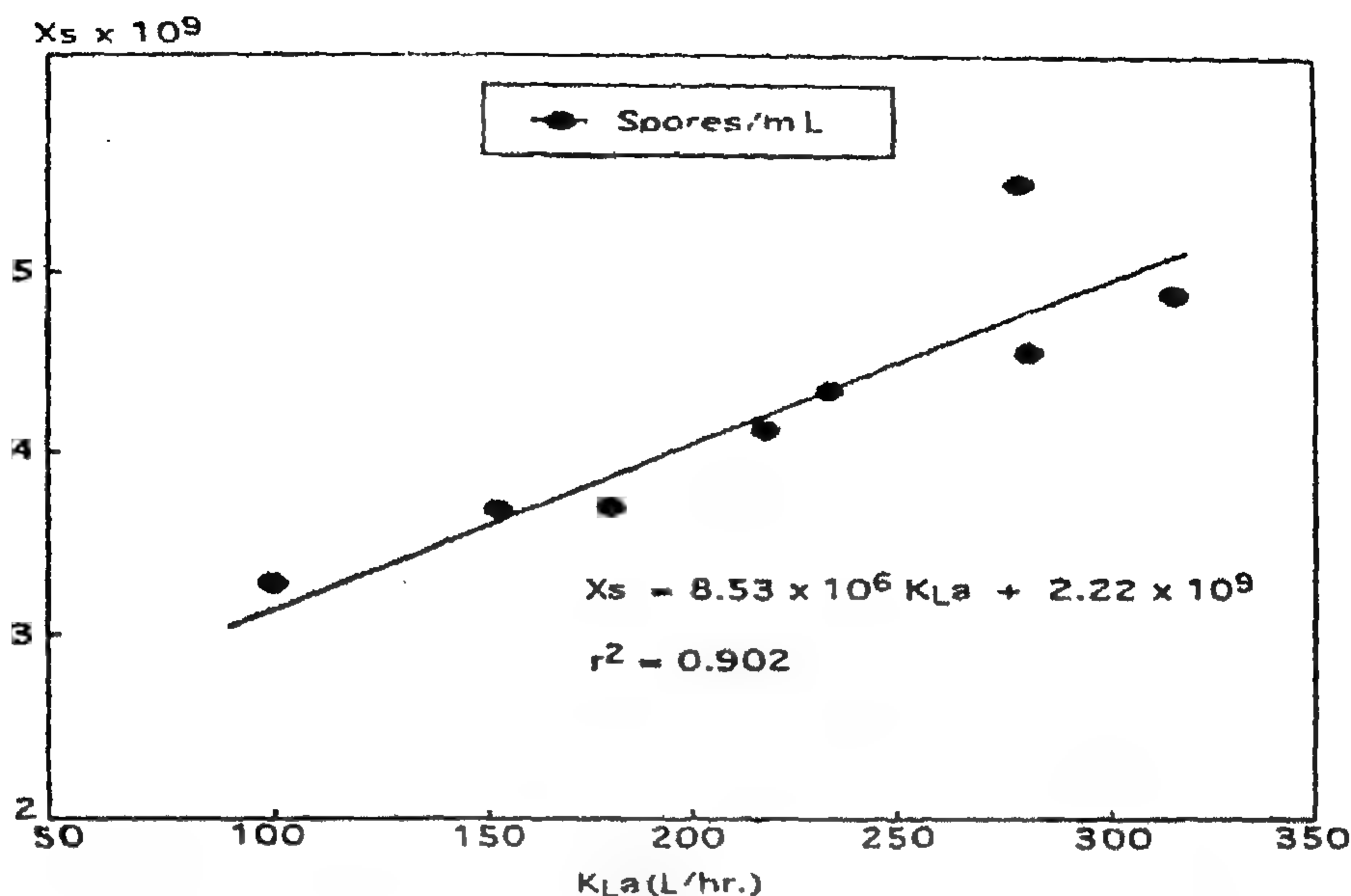
| طريقة التحضير | Biomass (g/L) الكتلة الحيوية | Biomass productivity (g/L-h) | Time (h) |
|-----------------------------------|---------------------------------|------------------------------|----------|
| Batch | 13.4 | 0.53 | 25 |
| Fed batch simulation | 49.8 | 1.99 | 25 |
| Fed batch with glucose feeding | 27.7 | 0.72 | 38.5 |
| Fed batch without glucose feeding | 23.5 | 0.92 | 25.5 |

زيادة او توسيع الانتاج Scale Up :

لكسى نستخدم K_{La} او معيار معدل انتقال الاكسجين (OTR) فان تأثير K_{La} على انتاج الجراثيم فى مزرعة القطفة قد درس. اظهرت النتائج علاقة وارتباط خطى (الشكل ٦-٣). التقارير الاولى اظهرت ان الاكسجين مهم لنمو وتجراثم (Holmberg B.t. واخرون ١٩٨٠، Anderson ١٩٩٠). لقد تمت نقلة مقدرة مزرعة القطفة من مخمر سعة ١٤ لتر الى ١١٠٠ لتر مع معدل نقل اكسجين ثابت (جدول ٦-٧). لقد كان تركيز الجراثيم ووقت التخمر متشابهها ولو ان $y_{x/s}$ ومعدل النمو الاقصى الخاص كانت مختلفة وكذلك فترة مرحلة التجراثم. المعيار الاخير كان اقصر للمخمر الاكبر. لقد وجد Holmberg واخرون (١٩٨٠) نقص فى معدل النمو الخاص لبكتريا B.t. عندما زادت من ٨ لتر حتى ١٠٠٠ لتر فى سعة المخمر. لقد اجريت التجارب لمعرفة اسباب هذا السلوك.



شكل (٦-٢): مزرعة القطفة المغذاة للباسيليس ثوريينجنسيز



شكل (٦-٣): العلاقة بين انتاج الجراثيم و K_{La} للباسيلليس ثورينجنسيز

جدول (٦-٧): زيادة الانتاج في خلال توسيع عملية التخمير لبكتريا Bt تحت OTR *

ثابت

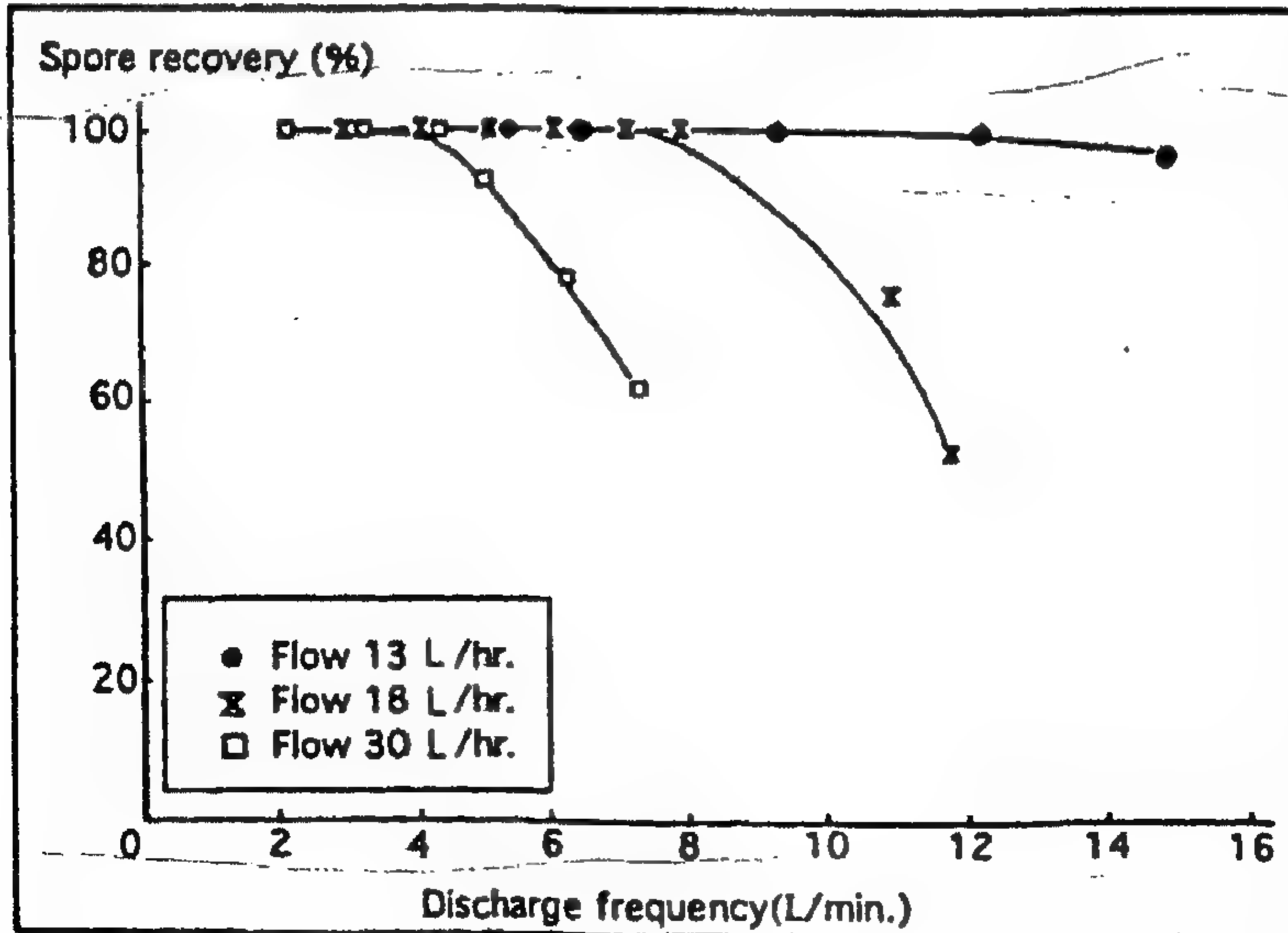
| | 14 L | 1100 L |
|--------------------|----------------------|----------------------|
| OTR (g/L-h) | 1.75 | 1.73 |
| X_e (spores/ml) | 4.8×10^9 | 5.1×10^9 |
| $X_{x/s}$ | 0.41 | 0.41 |
| P_v (spores/L-h) | 1.9×10^{11} | 2.2×10^{11} |
| U (L/h) | 0.78 | 0.67 |
| Time (h) | 25.5 | 23 |

* OTR = معدل انتقال الاكسجين Oxygen transfer rate

الاسترجاع Recovery:

لقد درست نظم استرجاع مختلفة كي تسترجع الجراثيم والبللوريات معا مع مخلفات الخلايا والمواد الصلبة المتبقية. في البداية تم دراسة تأثير درجة الحموضة والحرارة والمواد المجمعة على معدل الترسيب الحرج للمواد الصلبة من البيئة المتخمرة. تحت كل الظروف المختبرة كان معدل الترسيب الحرج منخفض جدا والقيمة الافضل كانت مرتبطة بدرجة الحموضة (٤). عند هذه الحموضة كان معدل الترسيب الحرج 1.9×10^9

م/ثانية بالمقارنة بقيمة 7×10^8 م/ثانية عند حموضة (٧). هذا التأثير نشر سابقا بواسطة Cords and Fisher (١٩٦٦). لذلك فانه لاغراض الاسترجاع كانت تحمض البيئة حتى درجة حموضة (٤). هذه العملية لم تحدث اى تعديل فى سمية المنتج (Villafora ١٩٩٠). بالتبعية اجريت العديد من التشغيلات على وحدة الطرد المركزى Westfalia (الشكل ٤-٦). لقد حدث تدهور فى اداء جهاز الطرد المركزى عند امتلاء فراغ الحماة او المواد الصلبة المتخالصة. لقد تاكد هذا الوضع من فقد المادة الصلبة مع التيار المناسب ومن ثم نقصت كفاءة استرجاع المادة الصلبة. من جهة اخرى فان فترات الصرف قصيرة المدة قللت من محتوى المواد الصلبة للتيار المركز. لذلك فان اختيار فترة صرف المواد الصلبة هو الذى يفصل ويميز بين التصفية الجيدة والمحتوى العالى من المواد الصلبة فى الجهات المفصولة. لقد كان التركيز الاعلى $7.2 - 7.5$ (DW) مع كفاءة استرجاع ٩٩% من الجراثيم. لقد اشار زامولا وآخرون (١٩٩١) ان المحتويات الصلبة ٩-١٥% وزن جاف عند استرجاع بكتريا Bt بالطرد المركزى. بينما هذه التركيزات اعلى من تركيزاتها الا ان الفقد (حوالى ١٢%) كان عالى ايضا. هذا قد يرجع الى الاختلافات فى مواصفات المواد الصلبة (حجم معبا).



شكل (٤-٦): تأثير معدل الانسياب على كفاءة استرجاع الجراثيم للباسبيليس ثورينجنسيز

الترشيح Filtration:

معدل ترشيح البيئة كان بطيئاً جداً بسبب سرعة انسداد سطح ورقة الترشيح بواسطة المواد الصلبة سببية الكعك. لذلك تم مضاهاة مرشح برميلي مستمر الدوران باستخدام مرشح ورقة الاختبار مع شريط من البولي استر والديكالين ٤١٢٧ سابق التغليف. لقد امكن الحصول على افضل النتائج مع دورة ٨٤ ثانية (غمس ٣١ ثانية وتجفيف ٤٤ ثانية). تحت هذه الظروف كان معدل الترشيح ١٨٧,٢ لتر/ساعة-م^٢ مع استرجاع جراثيم حوالى ٩٨,٥%. لقد كان معدل الترشيح متشابهاً مع مانشر عن سترتوبومايسيز فرادى وباسيلليس (Villafana ١٩٩٠).

REFERENCES

Anderson, T.B. (1990). Effects of carbon nitrogen ratio and oxygen on the growth kinetics of *Bacillus thuringiensis* and yield bioinsecticidal crystal protein. M.Sc. thesis, University of Western Ontario, Canada.

Arcas, J. ; Yantorno, O. and Ertola, R. (1987). Effect of high concentration of nutrients on *Bacillus thuringiensis* cultures. Biotechnol. Lett., 9 (2), 105-110.

Cords, H. and Fisher, R.A. (1966). Stable concentrate bacterial insecticide suspensions. USA patent 3 2 71 243.

Dawes, I.W. and Mandelstam, J. (1969). Biochemistry of sporulation of *Bacillus subtilis*. Continuous culture studies. In : Malek, I. ; Beyan, K. ; Fenel, Z. ; Munk, V. ; Ricica, J. and Smrkova, H. (eds.) Continuous Cultivation of Microorganisms. Acad. Press, 157-162.

Dawes, I.W. ; Kay, D. and Mandelstam, J. (1970). Sporulation in *Bacillus subtilis*. The theoretical and experimental studies in continuous culture systems. J. Gen. Microbiol., 62, 49-66.

Holmberg, A. ; Sievanen, R. and Carlberg, G. (1980). Fermentation of *Bacillus thuringiensis* of exotoxin production : Process analysis study. Biotechnol. Bioeng., 22, 1707-1724.

Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. Anal. Chem. 31, 426-428.

Rowe, G.E. and Margaritis, A. (1987). Bioprocess development in the production of bioinsecticides by *Bacillus thuringiensis*. Crit. Rev. Biotechnol., 6 (1), 87-127.

Mukhopadhyay, S.N. and Ghose, T.K. (1976). A simple dynamic method pf $k_L a$ determination in laboratory fermenter. J. Ferment. Technol., 54, 405-419.

Razo, E. (1991). Estudios para el escalamiento de un proceso por lote de nivel de laboratorio a planta pilot para la produccion de *Bacillus thuringiensis*. M.Sc. thesis. Unam., Mexico.

De Urquijo, E. (1987). Produccion de *Bacillus thuringiensis* para el control de ciertas plagas agricolas y medicas de importancia en Mexico. M.Sc. thesis. Cinvestav. Mexico.

Villafana, J. (1990). Evaluacion de alternativas para la recuperacion de los productos entomopatogenos de *Bacillus thuringiensis*. M.Sc. thesis, Cinvestav. Mexico.

Zamola, B. ; Valles P. ; Melig, Miccoli P. and Kajfez, F. (1981). Use of the centrifugal separation based on *Bacillus thuringiensis*. Biotechnol. Bioeng., 23, 1079-1086.

ثالثاً: الانتاج المحلى للباسيلليس ثورينجنسيز في مصر: المميزات والتحديات.

بالرغم من ان المنتجات التجارية والمستحضرات المبنية على الباسيلليس ثورينجنسيز كوسيلة مكافحة حيوية متوفرة حالياً في الاسواق الا انها باهظة التكاليف كى تستخدم في معظم الدول النامية. التكلفة العالية لوسائل مكافحة الحيوية ترجع اساسا الى ان الانتاج يتركز في الدول المتقدمة مثل اوربا وشمال امريكا حيث تكاليف الانتاج عالية وكذلك ارتفاع تكاليف النقل الى اماكن التشغيل والعمليات. لذلك فان انتاج هذه البكتريا في مستحضرات مناسبة في الدول التى تعاني من الافات المتوطنة لابد وان يقلل تكاليف عمليات مكافحة. كذلك يساعد هذا الاتجاه في تطوير صناعات التخمير المحلية في الدول النامية. في مصر وبسبب ان بحوث بكتريا B.t. تجرى ومازالت مستمرة منذ اكثر من ١٤ عام وحيث اصبحت العديد من الافات الحشرية التى تصيب المحاصيل الحقلية والزيتية والخضراوات متوطنة، لذلك اصبحت من الضروري اتخاذ القرارات للبدأ في عمل وحدات او مصانع او خطوط لانتاج مستحضرات B.t بناء على المواد الفعالة المتوفرة محليا وبمساعدة الشركات الصناعية المحلية. لتحقيق هذا الهدف اجريت دراسة لحصر افضل الاماكن لعمل مصنع على مستوى جيد. في هذا الموقع يفترض ان يكون هناك امكانيات تسمح بتنفيذ دراسات التخمير الاولى على نطاق مناسب. اظهرت نتائج الحصر ان افضل مكان لهذا الهدف هو شركة السكر والتقطير المصرية في الحوامدية احدى مدي محافظة الجيزة والتي تبعد ٢٠ كم جنوب المركز القومى للبحوث في مصر.

العوامل التالية كانت وراء قرار ملائمة شركة السكر والتقطير المصرية كاتسب

موقع لعمل خط انتاج على مستوى معقول لمستحضرات بكتريا الباسيلليس B.t.

١- الموقع قريب من المركز القومى للبحوث مما يسهل من الاتصال المباشر

والمعايشة والاشراف المباشر على عمليات التخمير.

٢- الشركة تملك وحدات كبيرة متحركة من المخمرات (حتى ٥ م^٣) مجهزة بكل

المستلزمات الضرورية المطلوبة لعمل التخمير وكذلك اجهزة الطرد المركزى

وجمع وتجفيف المنتج. الوحدة مصممة في الاساس لانتاج الخميرة وتتكون من

طرز اولى لخط التخمير بحيث يمكن ضبطها وتحويلها حتى تقابل اغراض انتاج

بكتريا باسيلليس.

٣- شركة السكر والتقطير المصرية معروف عنها انتاج الخميرة والمولاس التى

تستخدم كنواتج ثانوية رخيصة في عمل بيئة التخمير.

وصف مختصر لمكونات وحدة التخمر المتحركة في شركة السكر والتقطير بالحوامدية

١- مخمدردار ببدال العجلات: الطول ١٢,٥ م ، العرض ١,٤ م ، الارتفاع ٢,١٢ م ، الحجم الكلى ٥٤٠٠ لتر ، الحجم المتفاد منه ١٠٠٠ لتر ، الضغط الجوى العادى ، انقلاب يدار بالعجلات والبدال ، السرعة ٢٩,٥ لفة فى الدقيقة ، دفع القلاب بموتور ١١ KW.

٢- مغذى الماء البارد: وحدة تبريد الماء بالهواء البارد وحدة متحركة مصممة خصيصا للاستخدام خارج المبنى. تعمل الوحدة على التخلص من الحرارة المنفردة خلال عمليات التخمر. يستخدم الماء كمبرد كفاءة التبريد تصل الى 120.000 k.s./hr على درجة حرارة ١٤°م مع فتحة دخول الماء وحرارة ٨°م عند مخرج الماء يتكون الوحدة من اربعة مكونات رئيسية هى المضخة والمكثف والمبخر وصندوق التحكم.

٣- وحدة ضخ الهواء: تعمل الوحدة على خلق هواء مضغوط خالى من الزيت للتحكم الذاتى فى درجة حرارة المخمر ومجفف الهواء المسال. الوحدة مركبة فى خارج المبنى تتكون من مضخة دون تشحيم ، مجفف على درجة حرارة منخفضة ، مستودع هواء مضغوط ، صندوق التشغيل.

٤- مروحة ذات قناه افقية: تكلفة هواء مضغوط خالى من الزيت لتهوية المخمر. يتم سحب الهواء من خلال مرشح دقيق يفصل الشوائب ذات الحجم الاكبر من ٥ ميكرون عن طريق مرشح معقم بعد المبرد يدفع فى وحدة التخمر.

٥- وحدة طرد مركزى للتخلص من المواد الصلبة: تبلغ سرعة البرميل ٣٣٩٠ لفة فى الدقيقة.

٦- وحدة عمل المجبات من السوائل والاساس: وحدة تجيب السائل تعمل على تجفيف وتجيب عجينة الخميرة (يمكن اجراء محاولات مع بكتريا B.t.). مع تركيز المواد الصلبة ٢٠-٢٥%. يمكن تشغيل الوحدة بصورة مستمرة او على مستوى التحضير.

٧- سخان مستمر الاتسياب: يعمل على تزويد المخمر بالماء الدافئ على ٤٠-٥٥°م.

٨- خزانات متصلة بوحدة التخمر المتحركة: تشمل ستة خزانات معايرة ذات احجام مختلفة داخل وحدة التخمر المتحركة وهى خزان الا ذابة للبيئة المغذية (١٠٠٠ لتر) ، خزان استقبال المادة الوسيطة (١٠٠ لتر) ، خزان استقبال الحمض (٥٠ لتر) ، والماء قياس المادة الوسيطة (٥ لتر) ، خزان الناتج (٤٠٠ لتر) ، خزان التحلل الحرارى (١٠٠ لتر).

- ٩- مضخات في وحدة التخمر المتحركة: (سنة مضخات) واحدة للبيئة المغذية وواحدة للمولاس واخرى لتدوير الماء البارد وثلاثة للتخمير (المنتج) او يعلق عليها مضخات المعلقة وهي ذات معدلات تعريف مختلفة.
- ١٠- اجهزة القياس ووسائل التحكم: وهي تشمل وحدة للتحكم في الحرارة ، ودليل الحرارة وجهاز قياس الحموضة ووحدة قياس ثاني اكسيد الكربون.
- ١١- مصدر الطاقة لوحدة التخمر المتحركة: الوحدة مزودة بموتور كهربى مع وحدة ديزل.

(*) سوف اكتفى بهذا العرض مع محاولة الحصول على الوضع الراهن لانتاج Bt في مصر في معهد بحوث وقاية النباتات ومعهد بحوث الهندسة الوراثية....

الانتاج الدليلى الاولى لبكتريا Bt باستخدام وحدة التخمر المتحركة:

لقد تم تطوير اقترابات جديدة للحصول على بيئة عملية واقعية لانتاج الدلتا اندوتوكسين بواسطة سلالات Bt (سلامة واخرون ١٩٨٢ ، ١٩٨٣ ، ب). في هذه الاقترابات تم استخدام مواد رخيصة بما فيها النواتج الزراعية الصناعية والخميرة. لقد اجريت سلاسل من تجارب التخمر لانتاج B.t. اندوتوكسين على امتداد ثمانية اشهر باستخدام وحدة التخمر المتحركة المذكورة اعلاه. لقد سبق تجارب الانتاج بعض التجديدات الهندسية للوحدة المتحركة بحيث تتواءم وتتوافق مع غرض التخمر لانها مصممة في الاساس لانتاج الخميرة. هذه التحويرات شملت زيادة كفاءة الطرد المركزى لوحدة طرد المواد الصلبة وكذلك احداث تغيير كبير في تصميم المجفف ووظيفة بحيث يصبح قادرا على تجفيف سائل الرش لتحضير اندوتوكسين البكتريا Bt على درجات حرارة مناسبة.

١- انتاج Bt من الصنف جاليرى HD-234 على بيئة خميرة مغذية تقليدية:

من الدراسات الاولى تم اختبار سلالة Bt جاليرى تسمى HD-234 كاحدى السلالات الفعالة ضد الحشرات المستهدفة في برنامج البحوث الخاص بالمركز القومى للبحوث وهي دودة ورق القطن والدودة القارضة. لقد استخدم مصدر عدوى مناسب (١,٥ %) لحقن وعدوى ٥٠٠-١٥٠٠ لتر من البيئة المغذية للخميرة الروتينية ذات المكونات التالية (جم/لتر): خميرة مغذية جافة (٢٠جم) ، مستخلص خميرة (٢جم) ، جلوكوز (٢جم) ، بيتون (٢جم) ، فوسفات بوتاسيوم احدى الايدروجين (٤,٣جم) ، كبريتات ماغنسيوم مائية (٠,٤جم). لقد كانت الحموضة ثابتة حتى نهاية التخمر بالنظر الى كثافة المزرعة وقد لوحظ انخفاض طفيف خلال الخمسة عشر ساعة اولى متبوعا بزيادة قليلة حتى نهاية عملية التخمر بسبب السرعة القليلة لوحدة الطرد المركزى كانت انتاجية الاندوتوكسين

الجاف قليلة مع هذا اظهر تقييم فعالية الاندوتوكسين ضد يرقات العمر الثانى من دودة ورق القطن كفاءة عالية حيث اعطى ٩٢% موت.

تأثير اذابة الجلوكوز ومستخلص الخميرة على عملية التخمير

لقد تم تحويل بيئة الخميرة المغذية بما يحقق تخفيض التكاليف للمنتج المحلى. لذلك فان كلا مستخلص الخميرة والجلوكوز استبعدت من تركيب بيئة التخمير وكانت البيئة تتكون من (جم/لتر): خميرة مغذية جافة (٥٠ جم) ، فوسفات بوتاسيوم احادى الايدروجين (٢ جم) ، كبريتات الماغنسيوم (١٠٠ جم). لقد زاد حجم التخمير الكلى فى هذه القطعة الى ٣م^٣ فى مخمر بدال العجلات. بعد التبريد ثم ضبط درجة حموضة البيئة الى ٧,٥ مع ايدروكسيد الصوديوم عندما تبرد على ٥٠°م. مستوى التهوية وحجم العدوى كان هو نفسه فى التحضيرات السابقة. قيم الحموضة وكثافة المزرعة تم استكشافها على فترات وقد دونت النتائج فى جدول (٦-٩). لقد انخفضت درجة حموضة المزرعة الى (٧) خلال ثمانية ساعات من التخمير. بعد ذلك بدأت فى الارتفاع التدريجى حتى وصلت الى (٨) بعد يومان. بعد ذلك استمرت الحموضة فى الارتفاع حتى وصلت (٩) واصبحت ثابتة فى الاتجاه القلوى حتى نهاية فترة التخمير.

جدول (٦-٨): التغيرات فى حموضة وكفاءة المزرعة مع الوقت خلال عملية التخمير

(قطعة - ١) لبكتريا Bt جاليرى HD-234 فى وحدة التخمير المتحركة.

معدل التهوية ٨٥ م^٣/ساعة.

الحجم الكلى للمزرعة ٢٥٠ لتر. بيئة النمو كانت بيئة الخميرة المغذية الروتينية

| التخمير (ساعة) | كثافة المزرعة | درجة الحموضة PH | درجة الحرارة °م | التخمير (ساعة) | كثافة المزرعة | درجة الحموضة PH | التخمير (ساعة) |
|-------------------|------------------|-----------------------|--------------------|-------------------|------------------|-----------------------|-------------------|
| ٢٨ | ١,١١ | ٧,٢ | ٢٩ | ٢٢ | ١,٠١ | ٧,٤ | ٢٨ |
| ٤ | ١,١٢ | ٧,٢ | ٢٨ | ٢٧ | ١,١٠ | ٧,٥ | ٢٨ |
| ٥ | ١,١٣ | ٧,١ | ٢٨ | ٢٨ | ١,١٠ | ٧,٦ | ٢٧ |
| ٧ | ١,١٣ | ٧,٠ | ٢٨ | ٢٩ | ١,٠٩ | ٧,٧ | ٢٦ |
| ٨ | ١,١٣ | ٦,٨ | ٢٨ | ٣١ | ١,٠٩ | ٧,٨ | ٢٥ |
| ٩ | ١,١٣ | ٦,٦ | ٢٩ | ٤٨ | ١,١٠ | ٧,٨ | ٢٧ |
| ١٠ | ١,١٢ | ٦,٣ | ٢٩ | ٦٠ | ١,١٠ | ٧,٨ | ٣٠ |
| ١١ | ١,٠٥ | ٦,٠ | ٢٨ | ٦٤ | ١,١١ | ٧,٨ | ٣٠ |
| ١٢ | ١,٠٧ | ٦,٠ | ٢٨ | ٧٢ | ١,١١ | ٧,٨ | ٣٠ |
| ١٣ | ١,٠٧ | ٦,٠ | ٢٨ | ٧٩ | ١,١٢ | ٧,٨ | ٢٨ |
| ١٤ | ١,٠٨ | ٦,٢ | ٢٩ | ٨٤ | ١,١٣ | ٧,٨ | ٢٩ |
| ١٥ | ١,٠٨ | ٦,٤ | ٣٠ | ٨٥ | ١,١٣ | ٧,٨ | ٢٨ |
| ١٦ | ١,١٠ | ٧,٠ | ٢٨ | ٨٨ | ١,١٣ | ٧,٨ | ٢٧ |
| ١٧ | ١,١٠ | ٧,٢ | ٢٨ | ٩٠ | ١,١٣ | ٧,٨ | ٢٨ |
| ٢٠ | ١,٠٩ | ٧,٢ | ٢٨ | | | | |

جدول (٦-٩): تأثير استبعاد مصدر الكربون الحر على حموضة المزرعة والكثافة في تحويل FMI لبيئة الخميرة المغذية (تحضير رقم ٥٠). استخدم بكتريا Bt جاليري HD-234. الحموضة الابتدائية ضبطت على ٧,٤. الحجم الكلى للمزرعة كان ١م^٣.

| التخمير (ساعة) | كثافة المزرعة | درجة الحرارة م° | التخمير (ساعة) | كثافة المزرعة | درجة الحرارة م° | التخمير (ساعة) | كثافة المزرعة | درجة الحرارة م° |
|-------------------|------------------|--------------------|-------------------|------------------|--------------------|-------------------|------------------|--------------------|
| صفر | ١,١٠ | ٧,٤ | ٣٢ | ١,١٨ | ٨,٠ | ٣١ | ١,١٨ | ٨,٠ |
| ٢ | ١,١٦ | ٧,٢ | ٣١ | ١,١٨ | ٨,٢ | ٣٢ | ١,١٨ | ٨,٢ |
| ٣ | ١,١٦ | ٧,٠ | ٣٠ | ١,١٨ | ٨,٤ | ٣٢ | ١,١٨ | ٨,٤ |
| ٧ | ١,٢٦ | ٦,٩ | ٣٠ | ١,١٨ | ٨,٨ | ٣٠ | ١,١٨ | ٨,٨ |
| ٨ | ١,٢٦ | ٧,٠ | ٣١ | ١,١٨ | ٩,٠ | ٣٠ | ١,١٨ | ٩,٠ |
| ٩ | ١,٢٦ | ٧,١ | ٣٢ | ١,١٨ | ٩,٢ | ٣٢ | ١,١٨ | ٩,٢ |
| ١١ | ١,٢٦ | ٧,٣ | ٣٢ | ١,١٨ | ٩,٠ | ٣٢ | ١,١٨ | ٩,٠ |
| ١٢ | ١,٢٦ | ٧,٤ | ٣٢ | ١,١٨ | ٨,٨ | ٣٢ | ١,١٨ | ٨,٨ |
| ١٣ | ١,٢٦ | ٧,٦ | ٣٠ | ١,١٨ | ٨,٨ | ٣٢ | ١,١٨ | ٨,٨ |
| ٢٠ | ١,٢٤ | ٧,٨ | ٣٠ | ١,١٨ | ٨,٨ | ٣٢ | ١,١٨ | ٨,٨ |
| ٣٢ | ١,٢٠ | ٧,٨ | ٣٢ | ١,١٨ | ٨,٨ | ٣٢ | ١,١٨ | ٨,٨ |

هذه البيئة المخمورة (FMI) اعطت انتاجية عالية نسبيا من الاندوتوكسين وصلت لأكثر من ٢٠ كجم/م^٣. هذا بالرغم من ان الفاعلية انخفضت بشكل معنوي بالمقارنة بالتحضيرات السابقة. هذا قد يرجع الى توقف النمو في مرحلة مبكرة من التخمير بسبب الارتفاع السريع في درجة حموضة المزرعة.

ادخال وملائمة تركيزات المولاس والخميرة في بيئة التخمير

امكانية استخدام المولاس كمصدر اساسي للكربون اللازم لبكتريا B.t. درست مع التركيزات المختلفة. في تجارب اخرى اختلف تركيز الخميرة الجافة لاستيضاح المستويات المناسبة لكلا المكونات. الهدف الرئيسي كان الوصول الى تركيب بيئة مناسبة تصلح للانتاج المناسب لمستحضر الاندوتوكسين الفعالة وبكميات مناسبة. اظهرت نتائج تجارب التحضير هذه ان التركيزات التالية لمختلف المكونات في البيئة كانت اكثر ملائمة للانتاج الروتينى للانندوتوكسين الناتج من تخمر بكتريا Bt: الخميرة المغذية الجافة (٤٠ جم/لتر)، المولاس ٥٥% سكر (١٥ جم/لتر)، فوسفات البوتاسيوم احادى الايدروجين (١ جم/لتر)، كبريتات الماغنسيوم المائي (٢ جم/لتر). لقد تكررت هذه النسب واعطت نتائج جيدة وثابتة.

لقد تم تسجيل التغيرات التي حدثت في درجة حموضة وكثافة المزرعة خلال عملية التخمير باستخدام البيئة هذه مع Bt جاليري HD-234 و Bt كورستاكي HD-341. أظهرت البيانات سلوك متطابق لسلاسلات Bt في هذه البيئة حيث انخفاض في قيم الحموضة في المراحل المبكرة من النمو. هذا قد يرجع الى تكوين كمية من حامض الخليك من السكر الموجود في المولاس. لقد استتبع استهلاك السكر من البيئة بناء وزيادة تراكم حامض الخليك وتكوين منتجات قاعدية تؤدي الى تغير ثانى في درجة حموضة بيئة النمو في اتجاه القلوية. مع استمرار الحموضة في الارتفاع يحدث تجرثم وتكوين بللورات بالتوافق متبوعا بتحلل الاسبورينجيوم وتحرير الجراثيم والاندوتوكسين مع نهاية فترة التخمير. من المثير والجدير بالاهتمام ملاحظة ان كلا السلالات المختبرة اعطت نفس الاستجابة والسلوك موضح ان هذا السلوك عبارة عن صفة وراثية في انواع الباسيلليس B.t.

الجدول (٦-١٠) يوضح كفاءة مستحضرات الاندوتوكسين المتحصل عليها من بكتريا Bt جاليري HD-234 باستخدام بيئة FM4 في وحدة التخمير المتحركة. لقد تمت مقارنة النتائج مع المستحضر التجارى المعروف ديبيل 2x ضد يرقات العمر الثانى لدودة ورق القطن. اتضح كفاءة المستحضر المحلى لبكتريا B.t. مقارنة بالديبيل 2x بالرغم من محدودية استخدام وحدة التخمير المتحركة ذات السعة المحدودة التحكم في ظروف عملية التخمير.

جدول (٦-١٠): تأثير تركيز بعض تجهيزات الاندوتوكسينات ضد يرقات دودة ورق القطن

| نسبة موت اليرقات % عند التركيزات ميكروجرام/مليلتر | ٥٠٠ | ٢٥٠ | ١٢٥ | ٣٠٠ | ١٦٠ |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | | | | |
| ديبيل 2x- (مقارنة) | - | - | - | - | - |
| ١٦ | ٤,٥ | ٧٨ | ٥٣ | ١٦ | ١٦ |
| ١٦ | ٧,٠ | ٣٣ | ٣٣ | ١٣ | ١٦ |
| ١٧ | ٧,٠ | ٦٨ | ٣٠ | ٣٢ | ١٧ |
| ١٨ | ٧,٠ | ٤٨ | ١٦ | صفر | ١٨ |
| ١٩ | ٤,٥ | ٥٥ | ٦٥ | ٣٠ | ١٩ |
| ١٩ | ٧,٠ | ٥٨ | ٤٠ | ١٠ | ١٩ |
| ٢٠ | ٧,٠ | ٦٣ | ٦٧ | ٣٧ | ٢٠ |
| ٢١ | ٧,٠ | ٦٠ | ٦٠ | ٣٦ | ٢١ |

تجهيز اندوتوكسين بكتريا Bt المحلى:

يعتمد الفعل البيولوجي لبكتريا Bt على صفتان على نفس القدر من الاهمية هما كفاءة الاندو توكسين والمواد المضافة لزيادة الفاعلية والمقدرة والثبات. العامل الاخير والمحدود هو تجهيز مستحضر Bt. في عملية المستحضر يؤخذ في الاعتبار مواصفات اندوتوكسين Bt وظروف التطبيق. على سبيل المثال فانه تاكد من الدراسات الواسعة ان اندوتوكسين بكتريا Bt شديدة الحساسية للاشعة فوق البنفسجية ولذلك فان اضافة واقيات من هذه الاشعة تعتبر من المكونات الهامة والمحدودة لكفاءة المستحضر. بالنسبة للمواد الخاملة والحاملة فان الخليط المحلى من المعادن ذات حجم الجسيمات الاقل من ٤٤ قد تكون مفيدة ومحل اختيار. في بعض المستحضرات يضاف المولاس ضمن مكونات المساحيق القابلة للبلل. هذا ولو ان اضافة هذا المكون ينصح بان يكون في الخزان وتحت التجهيز لمحلول الرش اى وقت التطبيق tank-mix

المواصفات المطلوبة لمستحضر بكتريا B.t: فى سلسلة من الدراسات ثم تجهيز مسحوق من Bt قابل للانتشار فى الماء اخذين العوامل التالية فى الاعتبار:

١. الانسيابية ، القابلية للبلل ، التفرق والتعلق بما يحق توفير معلقات ثابتة تحقق توزيع جيد ومتوازن ومتجانس على النباتات المعاملة.
٢. اضافة المواد الوافية من الاشعة فوق البنفسجية UV-Protectant.
٣. يجب ان تكون المواد الاضافية والحاملة خالية من الرطوبة.
٤. ابطال فاعلية المواقع الحامضية النشطة على المادة الحاملة حتى حموضة pka اعلى من ٣,٣ للتأكد من الثبات عند التخزين.
٥. حيث ان الرغاوى غير مطلوبة فان المواد الاضافية تشمل مواد مضادة للرغاوى. لقد نشر مكونات المواد الفعالة الاساسية كنسب مئوية للمسحوق القابل للانتشار فى المادة المختبر محليا لمستحضر بكتريا Bt. Bt (٧٥% لمستحضر مسحوق WD)، مادة مبللة (٣%)، ناشرات (٢%)، واقى للاشعة فوق البنفسجية UV (٢%)، زيت (٠,٢٥%)، مثبطات النشاط (٠,٢٥%)، مانعات تكوين الرغاوى (٠,٥٠%)، مادة حاملة ٣٠٠ ش (١٧%).

الجدول (٦-١١): توضح نشاط بعض المستحضرات المجهزة محليا من Bt المنتجة في وحدة التخمر المتحركة. تمت مقارنة النتائج مع فعالية 2x Dipel. اظهرت البيانات ان المستحضر (D) هو الافضل تحت الظروف السائدة.

جدول (٦-١١): تقدير فعالية مختلف تجهيزات الاندوتوكسين المحضر محليا في Bt كورستاكي HD-341 ضد العمر اليرقي الثاني من دودة ورق القطن.

| النسبة المئوية للموت بعد سبعة أيام | مستحضر بكتريا Bt المستخدمة بمعدل ٥٠٠ ميكروجرام/مليلتر |
|------------------------------------|---|
| 67 | Dipel 2X (control) |
| 63 | B.t. endotoxin (As such) |
| 30 | Local formulation (A) |
| 50 | Local formulation (B) |
| 25 | Local formulation (C) |
| 70 | Local formulation (D) |

جدول (٦-١٢): اوضحت قيم التركيز النصف القاتل LC_{50} ضد يرقات العمر الثاني. لدودة ورق القطن بعض المستحضرات التجارية 2x Dipel. اوضحت النتائج ان المستحضرات المحلية كانت على الاقل على مستوى فاعلية الديبيل X٢ التجارى مرتفع التكلفة. فى الدراسات المستقبلية على المستحضرات سوف تجرى بحوث وتجارب لاستيضاح فترة حياة المستحضرات للتأكد من ثباته لمدة ١٢ شهر على الاقل تحت ظروف التخزين المعتدلة.

جدول (٦-١٢): تقدير LC_{50} لبعض مستحضرات اندوتوكسين الناتجة من وحدة التخمر المتحركة قبل وبعد تجهيز المستحضر ضد العمر الثاني ليرقات دودة ورق القطن.

| المركب المستخدم | B.t. | ظروف التجهيز | LC_{50} ميكروجرام/مليلتر |
|---------------------------------------|------------------------------|--------------------------------|----------------------------|
| Dipel 2x (مقارنة) | - | كما هو | ٦٨٦ |
| الانتاج المحلى تحضير (١٧) | كورستاكي HD341 | كما هو | ٣٤٠ |
| الانتاج المحلى تحضير (١٧) | كورستاكي HD341 | بعد التحضير والتجهيز | ٦٣٠ |
| الانتاج: تحضير مخلوط من اربعة تحضيرات | جاليرى HD234 جاليرى HD234 | كما هو بعد التحضير والتجهيز | ٥٨٠ ٥٦٣ |

REFERENCES

Salama, H.S. ; Foda, M.S. and El-Sharaby, A. (1982). A novel approach for whey recycling in production of bacterial insecticides. *Entomophaga* 28, 151-160.

Salama, H.S. ; Foda, M.S. and El-Sharaby, A. (1983a). Utilization of fodder yeast and agro-industrial by production of spores and biologically active endotoxins from *Bacillus thuringiensis*. *Zbl. Mikrobiol.* 38, 553-563.

Salama, H.S. ; Foda, M.S. ; Dulmage, H. and El-Sharaby, A. (1983b). Novel fermentation media for production of delta-endotoxins from *Bacillus thuringiensis*. *J. Invertebr. Pathol.* 41, 8-19.

رابعاً: استخدامات تجهيزات الباسيلليس ثورينجنسيز ضد الفراشة ذات الظهر الماسي "بلوتيل زيلوستيلا" في تايوان

المساحة الكلية الجارية المزروعة بالخضراوات وصلت ٢٠٠ ألف هكتار في تايوان وهي جزيرة تبلغ مساحتها الكلية ٣٦ ألف كيلومتر مربع. العديد من انواع الافات الحشرية تحدث على مدار العام بسبب موقعها المتميز في المناطق الاستوائية وتحت الاستوائية. الفراشة ذات الظهر الماسي (DBM) بلوتيل زيلوستيلا (الى) تعتبر من اكثر الافات التي تهاجم النباتات الصليبية وقد تأكد ان لها ٢٠ جيل في السنة (Toa and Lee ١٩٨١). مقاومة حشرة DBM لمجاميع المبيدات الحشرية المختلفة كانت متباينة ولكنها كانت خطيرة في تايوان وغيرها في الدول الاسيوية كما ذكر بواسطة شيبج (١٩٨٨). لذلك فان وسائل مكافحة البديلة تعتبر ذات اهمية ومطلوبة للمجابهة الفعالة لافات النباتات الصليبية. البكتريا القاتلة للحشرات باسيلليس ثورينجنسيز (B.t.) قدمت في تايوان منذ ١٩٥٨ والمركبات المحتوية على B.t. سجلت لأول مرة لمكافحة الحشرات عام ١٩٦٧ (Ho4 ١٩٨٩). اظهر الاستطلاع الميداني عن اوليات او اولويات استخدام المبيدات الحشرية بواسطة الفلاحين المحليين ان منتجات Bt تحتل المرتبة السادسة من بين ١٨ نوع مختلف من المبيدات التي شملها الحصر (اما ١٩٨٤). في الوقت الحالي تستخدم منتجات Bt في الغالب في مكافحة الحشرات التي تصيب الخضراوات في تايوان وهذا يوضح انها عريضة القبول لدى مزارعي الخضراوات للتطبيق الحقل. لسوء الحظ فان المعلومات عن المراحل المختلفة من تطبيقات مستحضرات B.t. هزيلة بالرغم من ان المواد الميكروبية دخلت في هذه الجزيرة منذ اكثر من ٣٠ سنة. في هذا المقام سوف نتناول مردور البحوث عن استخدام مستحضرات Bt لمكافحة حشرة الفراشة ذات الظهر الماسي على خضراوات العائلة الصليبية.

مواد وطرق الدراسة:

تم جمع سلالات مختلفة من الحشرة P. Xylostella من ستة مناطق موزعة على اجزاء مختلفة من تايوان. تم تربية الحشرة على اوراق الكرنب في حجرات نمو على درجة ٢٥°م. استخدام العمر السيرقي الثالث للتقييم الحيوي بانواعه. تم اختيار ثلاثة مستحضرات من بكتريا Bt للاختبارات وهي الباكثوسبين (فرنسا-بيوكيم) والديبيل (ابوت) والثوروسيد (ساندوز) وجميعها كانت في صورة مساحيق قابلة للبلل WP مع ١٦٠٠٠

وحدة دولية/ملجم. اجريت اختبارات معملية لتقدير حساسية حشرة DBM للسلاسلات المختلفة من Bt وكذلك تم دراسة المرضية وحيوية جراثيم Bt ومدى تأثيرها بالحموضة لماء التخفيف ودرجة حرارة التحضين. تم اجراء التقييم الحيوى للبكتريا مع اضافة مادة Sinigrin والكانيونات كذلك درس تأثير الجرعات تحت القاتلة من بكتريا B.t. على حشرة DBM. علاوة على ذلك اجريت اختبارات حقلية على مستحضرات بكتريا Bt ضد الحشرة حيث اجريت التجارب فى موسم الشتاء (نوفمبر-يناير) وتم تخفيف المنتجات بالماء ١٠٠٠ مرة كما تم اضافة بعض المواد الاضافية. اجريت الرشوة الاولى عند مستوى ٣-٤ اوراق لكل نبات وبعد ذلك اجريت اربعة رشوات على فترات اسبوعية بين كل منها. استخدمت مبيدات البيرمثرين والكارتاب للمقارنة. تم حصر عدد اليرقات على ٢٠ نبات فى كل قطعة تجريبية قبل الرش بيوم واحد وبعد ٣ ايام من الرش. تم قياس المساحات النالفة من الاوراق لتقييم الفاعلية وكفاءة المكافحة.

النتائج التى اسفرت عنها الدراسة:

١- مرضية Bt للسلاسلات المختلفة من حشرة DBM:

تظهر النتائج فى جدول (٦-١٣) ان سلاسلات الحشرة التى جمعت من الاماكن المختلفة من تاوان كانت جميعها حساسة له مستحضرات Bt المختبرة حيث لم تتعدى الاختلافات فى معايير الموت LC_{50} ، LC_{75} اكثر من ٣ مرات بين السلاسلات . السبب استخدام Bt فى مكافحة الحشرات على الخضراوات لاكثر من حقتان زمنيتان فى تاوان لم تظهر الدراسة اختلافات ملحوظة فى مرضية البكتريا للحشرة مما يدل على ان هذه البكتريا مازالت تعمل بنجاح فى مكافحة الحشرة فى تاوان.

جدول (٦-١٣): مقارنة بين مرضية باسيليس ثورينجنسيز على مختلف سلالات بلوتيللا زيلوستيلا المجموعة من مختلف اماكن تايوان

| Strain ^{١)} السلالة | B.t. conc. (IU/ml) | | | | | | |
|---------------------------------|--------------------|-------|------------------|-------|------------------|-------|-------|
| | LC ₅₀ | Ratio | LC ₇₅ | Ratio | LC ₉₀ | Ratio | Slope |
| BC | 98.2 | 1.0 | 437.3 | 1.0 | 3.757.4 | 1.0 | 1.04 |
| CH | 132.9 | 1.4 | 730.6 | 1.7 | 8.507.8 | 2.3 | 0.91 |
| LC | 134.3 | 1.4 | 1.040.9 | 2.4 | 9.881.7 | 2.6 | 0.76 |
| TC | 196.3 | 2.0 | 811.8 | 1.9 | 6.274.4 | 1.7 | 1.09 |
| TL | 91.0 | 0.9 | 609.9 | 1.4 | 9.446.4 | 2.5 | 0.82 |
| TT | 284.3 | 2.9 | 1.309.2 | 3.0 | 11.812.0 | 3.1 | 0.62 |

١) BC (Ban-chiao), CH (Chang-hua). LC (Lu-chu), TC (Tou-cheng), TL (Ta-li), TT (Tai-tung)

٢- العوامل المؤثرة على كفاءة مستحضرات Bt ضد حشرة DBM:

٢-١- حموضة ماء التخفيف:

في التطبيق العملي لا يلقي الفلاحون بالحموضة ماء التخفيف الموجودة بالقرب من حقول الخضراوات. لذلك كان من الاهمية بمكان استيضاح هذا التأثير.

الجدول (٦-١٤): يوضح حدوث نسب متقاربة من موت اليرقات على درجات حموضة تتراوح من ٢ وحتى ١٠ وقد لوحظ اختفاء حيوية الخلايا تماما مع حموضة (٢). لذلك لا خوف على الفلاحين من هذا العامل عند استخدام مستحضرات Bt في الحقل.

جدول (٦-١٤): تأثير الحموضة على عنف وحيوية جراثيم Bt على حشرة DBM

| PH | الموت % | حيوية الخلايا (مستعمرات/ملي) |
|----|---------------|------------------------------|
| | Mortality (%) | Viable cells (colonies/ml) |
| 2 | 95.7 ± 4 | 0.000 |
| 4 | 95.8 ± 6 | 3.030 |
| 6 | 100.0 ± 0 | 1.346 |
| 7 | 97.6 ± 3 | 1.710 |
| 8 | 100.0 ± 0 | 2.083 |
| 9 | 100.0 ± 0 | 1.277 |
| 10 | 97.7 ± 0 | 3.780 |

٢-٢- تأثير درجات الحرارة على حيوية جراثيم B.t.: اظهر التقييم الحيوى لحيوية B.t. على بيئة المزرعة نتائج متفاوتة بالرغم من ان Bt استمرت في النمو على درجات الحرارة المرتفعة عندما تخلط بالمواد الاضافية (جدول ٦-١٥). امكن الكشف عن مستعمرات Bt على درجة حرارة ٢٠°م وحتى ٣٥°م بعد الاستخدام لمدة ١٤ دقيقة. لقد اقترح ان الحرارة لم تضر بشكل خطير بحيوية الجراثيم بعد الرش على النباتات.

جدول (٦-١٥): ثبات بكتريا Bt على درجات الحرارة المختلفة

| Treatment | Temp. (°C) | No. Colonies/mm ² | | | | | |
|--------------------|---------------|---------------------------------|-------|-------|-----|------|-----|
| | | Day intervals after application | | | | | |
| | | 0 | 1 | 2 | 4 | 7 | 14 |
| B.t. only | 20 | 223.2 | 55.7 | 152.8 | 4.6 | 0.0 | 4.5 |
| | 25 | | 77.8 | 23.1 | 0.3 | 4.4 | 3.7 |
| | 30 | | 156.2 | 6.1 | 4.7 | 4.7 | 1.7 |
| | 35 | | 2.9 | 14.7 | 0.0 | 1.5 | 2.8 |
| B.t. + Sandovit | 20 | 78.2 | 13.9 | 127.3 | 0.0 | 0.7 | 4.4 |
| | 25 | | 36.8 | 126.8 | 0.0 | 3.7 | 0.1 |
| | 30 | | 2.1 | 5.1 | 2.8 | 0.4 | 0.2 |
| | 35 | | 9.4 | 216.3 | 0.0 | 15.1 | 0.3 |
| B.t. + Agral 90 | 20 | 60.5 | 15.9 | 121.0 | 0.0 | 5.1 | 1.2 |
| | 25 | | 13.6 | 8.1 | 1.6 | 6.0 | 1.6 |
| | 30 | | 10.9 | 0.6 | 2.6 | 0.6 | 1.5 |
| | 35 | | 9.8 | 11.8 | 0.0 | 2.3 | 2.2 |

٢-٣- تأثير Sinigrin على كفاءة بكتريا B.t. ضد حشرة DBM:

لقد تحققت زيادة في فعالية بكتريا B.t. ضد حشرة DBM عندما اضيف السينيجرين لتركيزات واطية من بكتريا الباسيلليس Bt مثل ٣,٢ وحدة دولية/مليلتر كما لوحظت زيادة في موت اليرقات مع ١,٦ ، ٣٢ وحدة دولية/مليلتر. التأثير الافضل لمادة Sinigrin تحصل عليها من ٠,٠١ جزء في المليون في ١,٦٠ وحدة دولية/مليلتر. لقد كانت الجرعة المناسبة من السينيجرين ٠,٠١ جزء في المليون مع التقييم الحيوى لتركيزات مختلفة من Bt (جدول ٦-١٦).

جدول (٦-١٦): تأثير مضاف Sinigrin على عنفوانية بكتريا Bt على حشرة DBM

| تركيز البكتريا | جزء في المليون | | | | موت اليرقات (%) |
|----------------|----------------|-------|------|------|-----------------|
| B.t. conc. | | | | | تركيز سينجرين |
| (IU/ml) | 0 | 0.001 | 0.01 | 0.1 | 1.0 |
| 3.2 | 12.5 | 23.5 | 44.8 | 50.8 | 79.6 |
| 16.0 | 21.1 | 44.0 | 54.3 | 52.8 | 51.8 |
| 32.0 | 48.2 | 63.3 | 72.0 | 54.2 | 66.7 |
| 160.0 | 60.0 | 72.0 | 82.9 | 77.0 | 78.4 |

٢-٤- زيادة مرضية بكتريا Bt بواسطة الكاتيونات:

الجدول (٦-١٧) يوضح ان اضافة املاح مختلفة لتجهيزات البكتريا Bt قد تزيد من المرضية على حشرة DBM خاصة كلوريد الكالسيوم الذى ادى الى زيادة مقدارها ٦ امثال بناء على قيم التركيزات النصفية القاتلة LC_{50} . الاملاح الاخرى قد تحفز وتزيد من مرضية Bt بدرجات معينة لذلك فان الكاتيونات فعالة في زيادة كفاءة Bt ضد حشرة DBM.

جدول (٦-١٧): تأثير الكاتيونات على مرضية Bt لحشرة DBM

| Salt (0.5%) | B.t. conc. (IU/ml) | | | |
|---------------------------------|--------------------|-----------|-----------|-------|
| | LC_{50} | LC_{75} | LC_{95} | Slope |
| B.t. only | 209.3 | 2.382.8 | 79.158.0 | 0.64 |
| CaCl ₂ | 33.5 | 105.4 | 548.7 | 1.36 |
| MgCl ₂ | 85.6 | 385.7 | 3.373.9 | 1.03 |
| Na ₂ CO ₃ | 89.1 | 338.8 | 2.319.3 | 1.16 |
| K ₂ CO ₃ | 175.3 | 254.4 | 435.0 | 4.17 |

تأثير الجرعات تحت القاتلة من بكتريا B.t. على حشرة DBM:

الجرعات تحت القاتلة من بكتريا الباسيلليس Bt قد تسبب خفض في نسبة الفقد ووزن العذارى والحشرات الكاملة الناتجة كما تطيل من فترة دوام العذارى لحشرة DBM (جدول ٦-١٨). في هذه الدراسات اعتبرت ٣٢ وحدة دولية/مليلتر او اقل جرعة تحت مميتة وقد وجد ان تعذير وخروج فراشات حشرة DBM كانت حوالى ٦٠% بالمقارنة بما يزيد عن ٩٠% مع مجموعة المقارنة ولو ان نسبة موت اليرقات كانت ٢٨% فقط. لذلك

فان استخدام الجرعة تحت القاتلة تكون فعالة في خفض تطور الحشرة كما تفيد بشكل معنوي في مكافحة الافات

جدول (٦-١٨): تأثير الجرعة تحت القاتلة على موت اليرقات وتطور حشرة DBM

| الجرعة | عدد اليرقات | موت اليرقات % | التعذر % | وزن العذارى | دوام التعذر | خروج الفراشات % |
|--------------|-------------|----------------------|--------------|----------------|-----------------------|---------------------|
| Dose (IU/ml) | No. larvae | Larval mortality (%) | Pupation (%) | Pupal wt. (mg) | Pupal duration (days) | Adult emergence (%) |
| 0.0 | 81 | 1.10 | 97.50 | 5.05 | 3.68 | 92.40 |
| 3.2 | 131 | 16.11 | 87.50 | 4.85 | 3.64 | 75.98 |
| 16.0 | 122 | 14.34 | 83.54 | 4.64 | 3.64 | 73.58 |
| 32.0 | 148 | 28.05 | 63.24 | 4.70 | 4.70 | 60.98 |
| 160.0 | 128 | 61.18 | 42.82 | 3.73 | 4.13 | 19.73 |
| 320.0 | 119 | 69.64 | 39.90 | 3.64 | 3.95 | 9.78 |

اختبارات حقلية لمستحضرات Bt ضد حشرة DBM على القرنبيط:

الجدول (٨-١٩) يوضح ان ٣ مستحضرات مختلفة من بكتريا Bt كانت افضل قليلا من الكارتاب ومبيد البيرمثرين على معايير عدد اليرقات على الاوراق خاصة مع اضافة الاجرال -٩٠ للمستحضرات. تقييم مساحات اوراق القرنبيط التي تلفت واختبرت بواسطة حشرة DBM اوضحت افضلية لتجهيزات بكتريا Bt بالمقارنة بالكارتاب والبيرمثرين من الواضح ان مستحضرات Bt كانت اكثر فاعلية في مثل حشرة DBM عما هو الحال مع المبيدات الحشرية الكيميائية تحت الظروف الحقلية في تايوان. في النهاية اود الاشارة الى الكشف حديثا عن تطور ظاهرة المقاومة في حشرة DBM ضد مستحضرات بكتريا الباسيلليس Bt في هاواي (Tabashrik وآخرون ١٩٩٠). اوضحت الدراسة الحالية استمرار فاعلية Bt في مكافحة الفراشة ذات الظهر الماسي على النباتات الصليبية في تايوان. كذلك اتضح الدور الهام للعوامل الطبيعية مثل الحموضة والحرارة والمواد الاضافية في تحديد كفاءة مستحضرات بكتريا Bt في الحقل. لقد ذكر ان

مضاف Sinigrin وهو مستخلص من اوراق النباتات الصليبية وعادة جليكوسيد زيت الخردل يعمل كمنشط للتغذية لحشرات ابي دقيق الكرنب DBM (Bech ml Reeve) (١٩٧٦). وجد ان طعم المستحضر المحتوى على مستخلصات بذور القطن وهو محفز ومنشط للالتهام قد يزيد من كفاءة Bt ضد دودة ورق القطن (النقراشي وآخرون ١٩٨٦). جدول (٦-١٩): اعداد يرقات DBM على القرنبيط بعد الرش بمستحضرات مبيدات حشرية مختلفة (شاج هاور ١٩٨٧)

| المعاملة | التخفيف ١٠ م | No. of larvae ¹⁾ عدد اليرقات | | | | |
|----------------------|-----------------|---|--------------------|---------------------|--------------------|---------------------|
| | | تاريخ الرش | | | | |
| | | Nov. 27 | Dec. 8 | Dec. 19 | Dec. 29 | Avg ²⁾ |
| Cartap | 1x | 44.3 ^a | 10.8 ^{bc} | 54.3 ^{ab} | 28.8 ^{bc} | 34.5 ^{ab} |
| Permethrin | 2x | 25.3 ^{abc} | 18.9 ^{ab} | 46.0 ^{abc} | 42.0 ^{ab} | 33.3 ^{abc} |
| Dipel | 1x | 21.3 ^{abc} | 9.8 ^{bc} | 35.8 ^{bcd} | 25.8 ^{cd} | 23.1 ^{bcd} |
| Bactospeine | 1x | 20.0 ^{abc} | 6.8 ^c | 33.5 ^{bcd} | 22.8 ^{cd} | 20.8 ^{bcd} |
| Thuricide | 1x | 12.0 ^{bc} | 10.8 ^{bc} | 18.0 ^{cd} | 19.8 ^{cd} | 15.1 ^{cd} |
| Thuricide + Agral 90 | 1x & 5x | 8.0 ^c | 6.8 ^c | 12.5 ^{cd} | 12.3 ^d | 9.9 ^d |
| Thuricide + Agral 90 | 0.8x & 5x | 21.2 ^{abc} | 8.8 ^{bc} | 22.5 ^{bcd} | 20.3 ^{cd} | 18.3 ^{bcd} |
| Thuricide + Agral 90 | 0.5x & 5x | 21.8 ^{abc} | 6.8 ^c | 8.9 ^d | 12.3 ^d | 12.4 ^d |
| Check | | 38.0 ^{ab} | 22.0 ^a | 73.8 ^a | 59.3 ^a | 48.3 ^a |

1. Means followed by the same letter are not significantly different at 5%.

2. No. of larvae per 10 plants.

REFERENCES

Akiba, Y. and Katoh, K. (1986). Microbial ecology of *Bacillus thuringiensis*. V. Selection medium for *Bacillus thuringiensis*. Vegetative cells. Jpn. Appl. Ent. Xool., 21 , 210-215. (In Japanese).

Alford, A.R. and Holmes, J.A. (1986). Sublethal effects of carbaryl, aminocarb, fenitrothion, and *Bacillus thuringiensis*. On the development and fecundity of the spruce budworm (Lep., Tortricidae). J. Econ. Entomol., 79 , 31-34.

Beck, S.D. and Reeve, J.C. (1976). Insect-plant interaction : nutrition and metabolism. In "Recent Advances in Phytochemistry Biochemical Interaction between Plants and Insects" (J.W. Wallace, ed.). Plenum Press, N.Y. and London. 10, 41-92.

Chang, L.C. (1972). Vegetable insect control by thuricide and other insecticides. Taiwan Agric. Quart., 8 , 164-169. (In Chinese).

Cheng, E.Y. (1988). Problems of control of insecticide-resistant *Plutella xylostella*. Pestic. Sci., 23, 177-188.

El-Nockrashy, A.S.; Salama, H.S. and Taha, F. (1986). Influence of bait formulations on the effectiveness of *Bacillus thuringiensis*. Against *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lep., Noctuidae). J. Appl. Entomol., 101, 381-389.

Falcon, L.A. (1971). Use of bacteria for microbial control. In "Microbial Control of Insects and Mites" (H.D. Burges and N.W. Hussey, eds.). Academic Press, London and N.Y., 67-95.

Hou, R.F. (1989). Control of the diamondback moth, *Plutella xylostella*, using entomopathogens. Chinese J. Entomol., Special Publication No. 4, 46-52. (in Chinese).

Hou, R.F. and Hsiao, M.L. (1986). An improved diet for rearing the diamondback moth, *Plutella xylostella*, and its requirements for fatty acids. Chinese j. Entoml., 6, 31-37.

Ignoffo, C.M. and Gregory, B. (1972). Effects of *Bacillus thuringiensis*. —exotoxin on larval maturation, adult longevity, fecundity, and egg viability in several species of Lepidoptera. Environ. Entomol., 1, 269-272.

Kirsch, K. and Schmutterer, H. (1988). Low efficacy of a *Bacillus thuringiensis*. (Berl.) formulation in controlling the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.), in the Philippines. J. Appl. Ent., 105, 249-255.

Li, G.C. (1984). Residue problems associated with insecticide use on vegetables and their preventions. Proc. Symp. Insect control Vegetables in Taiwan. Dept. of Agriculture and forestry, Taiwan Provincial Government. 116-133. (In Chinese).

Salama, H.S.; Foda, M.S. and Sharaby, A. (1984). Novel biochemical avenues for enhancing *Bacillus thuringiensis*. Endotoxin potency against *Spodoptera littoralis* (Lep. : Noctuidae). Entomophaga, 29, 171-178.

Tabashnik, B.E. ; Cushing, N.L.; Finson, N. and Johnson, M.W. (1990). Field development of resistance to *Bacillus thuringiensis*. In diamondback moth (Lepidoptera : Plutellidae). J. Econ. Entomol., 83, 1671-1676.

Tao, C.C. and Lee, H.S. (1981). Population fluctuation of cruciferous insect pest and their control in Taiwan. Proc. Symp. Production and Insect control of Cruciferous Vegetable in Taaiwan. (.N. Chen and W.Y. Su, eds.). 16-31. (In Chinese).

خامسا: التحديات والصعوبات التي تجابه استخدام الباسيلليس ثورينجنسيز في الفلبين. من مقالة للباحث L.E.Padua بالمعهد القومي للتكنولوجيا الحيوية والميكروبيولوجيا التطبيقية (Biotech) جامعة الفلبين-لوس بانوس-لاجونا-٤٠٣-الفلبين. لقد قدم الباحث بالقول بأهمية بكتريا Bt في مكافحة الحشرات ذات الأهمية الاقتصادية والطبية. أدت البحوث عن كفاءة وفعالية هذه البكتريا إلى الإسهام في تطوير وسائل مكافحة الميكروبية ليس فقط حشرات حرشفية الأجنحة (Heimpel ١٩٦٧، دلماج وتوبيراتورز ١٩٨١، فاوست وبولار ١٩٨٢) ولكن ضد حشرات ثنائية الأجنحة كذلك (جولدبرج ومارجاليت ١٩٧٧، de Barjac ١٩٧٨، اندين وناجيل ١٩٧٨ وغيرهم) حديثا أعلن عن تحت نوع جديد من Bt ذات سمية عالية ضد حشرات غمدية الأجنحة في ألمانيا وأمريكا (كريج وآخرون ١٩٨٣، هيرمستدات وآخرون ١٩٨٦). التوزيع الواسع لهذه البكتريا نشر بواسطة العديد من الباحثين. في الفلبين أجريت المحاولات الأولى لعزل وتعريف هذه البكتريا عام ١٩٨٢ (بودوا وآخرون ١٩٨٢) ولو أن جابرييل (١٩٦٨، ١٩٧٠) أشارا إلى إدخال وتتابع استخدام التجهيزات التجارية للباسيلليس تحت النوع ثورينجنسيز من الطرز السيولوجي H.1. اكتشاف عزلات جديدة من Bt ذات قيمة في إبادة الحشرات وملائمة الاستخدام أعطت أهمية لهذه البكتريا في مكافحة الحيوية. في هذا المقام سوف نتناول البحوث التي أجريت وبعض التحديات التي تجابه استخدام بكتريا Bt في الفلبين. السمية الكمية اختبرت على هذه البكتريا التي تكون جراثيم بللورية حيث الآفات الحشرية الهامة محليا التي تصيب الذرة والصليبات والأرز وجوز الهند وبعض الحبوب والمنتجات المخزونة. لقد أجرى تقييم حيوى لآلقاء الضوء على فعالية هذه البكتريا ضد بعض الممرضات البكتيرية والفطرية على بعض الحاصلات الزراعية.

Bt ضد الحشرات والأمراض ذات الأهمية الاقتصادية:

الذرة والصليبات والأرز وجوز الهند من المحاصيل الرئيسية في الفلبين كما تعتبر الحشرات والآفات والأمراض من بين العوامل المؤثرة على الإنتاجية المحصولية. مكافحة هذه الآفات تعتمد على المبيدات الحشرية الكيميائية ولو أن فعاليتها كانت محدودة بدرجات متفاوتة. من المثير للاهتمام أن مجاميع الحشرات والممرضات النباتية طورت مقاومة لعدد من هذه الكيميائيةات بسبب الاستخدام المكثف وغير العقلاني. لقد أدى هذا الوضع إلى عدم توازن إيكولوجي خلال تحطم أو القضاء على الكائنات غير المستهدفة مثل المفترسات

والطفيليات وكذلك تراكم المخلفات السامة في البيئة. لقد استدعى هذا الموقف ضرورة تطوير بدائل او طرق اضافية لمكافحة الافات.

تقييم كفاءة Bt ضد ثاقبة الذرة الاوربية:

اظهرت اختبارات التقييم الحيوى لبكتريا Bt ضد ثاقبة الذرة الاوربية *Ostrinia Furnacalis* الدليل الاول عن الاختلافات الظاهرة في مستوى سمية العزلات المحلية والمستوردة (بادوا واخرون ١٩٨٧-٩). بناء على العزلات ٢٦٥ المختبرة ضد يرقات العمر الثالث كانت مستحضرات LEP-20، HD-23، PG-02 اكثر سمية بتقييم LC50 تساوى ٨٥,٩٢ ، ٩٣,١٧ ، ١٤١,٠١ ملجم/لتر بيئة على التوالي. لقد حدث موت في اليرقات بعد يومان من المعاملة بمستحضرات LEP-20 و PG-02. لقد وجد ان اليرقات المعدية تستهلك غذاء اقل من المعاملة الخاصة بالمقارنة.

Bt ضد الفراشة ذات الظهر الماسى:

الفراشة ذات الظهر الماسى من الافات الخطيرة لنباتات العائلة الصليبية في الفلبين. مكافحة تعتمد على استخدام المبيدات الحشرية مما ادى الى ظهور سلالات مقاومة بشكل ملحوظ. مع تخفيف القليل من العزلة فى ١٠٠ مليلتر ماء مقطر حيث اعطى المستحضرات نسبة موت ٦٠-٨٨% بعد ٢٤ ساعة من المعاملة بعزلات HD-61، HD-54، PG-02، LEP-13، LEP-21 ضد يرقات العمر الثالث (بادوا واخرون ١٩٨٧-٩). العزلة المحلية PG-02 وجدت سامة للبلوستيلا والوسترينيا بينما عزلة HD-1 كانت اقل سمية.

حساسية بعض افات حرشفية الاجنحة التى تصيب الارز لبكتريا Bt:

لقد اتضح انه من بين ٣٠٠ عزلة من B.t. اعطى اكثر من ٥٠% سمية ضد لافات الاوراق والديدان الخضراء الشعرية ، ثاقبة الساق الصفراء ، ثاقبة الساق المخطط ، دودة الارز المكسية. لقد اختلفت حساسية اليرقات لعزلات Bt وكذلك وجد ان ثاقبات الساق فى الارز مقاومة بالمقارنة بالافات الاخرى التى تصيب الارز. من بين ٢٨٧ عزلة استخدمت فى تجارب التقييم الحيوى ضد ثاقبة الاوراق الخضراء *N-aenescens* اتضح ان LEP-54، LEP-57، LEP-38، 54 كانت الاكثر سمية. لقد كانت سمية العزلات الاربعة

مقارنة بالعزلتين اللتان اخذتا من المنتج التجارى (I and II) الموجودة فى الاسواق الفلبينية. لقد وجد ان سلالتى LE-54 و LEP-54 كانت اكثر سمية من I و II بقيم LC50 ٢,٦ ، ٣,٨ مللجم/لتر على التوالى (جدول ٦-٢٠).

جدول (٦-٢٠): قيم LC50 لعزلات Bt ضد العمر اليرقى الثالث لحشرة لافات الاوراق الخضراء اللوز.

| العزلة | Lc ₅₀ (mg/L)* | Fiducial Limit (mg/L) |
|--------|--------------------------|-----------------------|
| I | 4.7 ^a | 2.5-8.9 |
| II | 7.9 ^a | 2.7-47.5 |
| LEP-38 | 16.9 ^a | 6.5-54.7 |
| LEP-54 | 3.8 ^u | 1.5-9.4 |
| LEP-57 | 7.3 ^a | 3.9-12.3 |
| LEP-59 | 2.6 ^u | 1.3-47 |

فاعلية Bt ضد افات الحبوب المخزونة:

لقد تم اختبار ١٤٥ عزلة ضد حشرات الحبوب المخزونة ريزوبيرثا دومينكا، سيتو فيليس زياميز، ترايبولسيوم كاستانيم. لقد اعطت ٣٠ عزلة ٥٠-٨٠% موت ضد الريزوبيرثا. عندما استخدمت هذه العزلات فى اختبار تاكيدى اعطت ٦ عزلات ٥٠-٦٠% موت. معظم العزلات المختبرة اعطت من صفر-٢٥% موت فقط. لم يثبت وجود اى من العزلات المختبرة ذات سمية ضد T.Castaneums S.Zeamais. عند فحص الحشرات الكاملة الناتجة من البيئة المعاملة بعد شهرين وجدت عزلات احدثت خفض فى مجموع الحشرات ٥٠-١٠٠% عن المقارنة وكذلك ٥٠-١٠٠% اعلى من المقارنة. خفض او زيادة التعداد فى بعض الصفات المعاملة ببعض عزلات البكتريا يجب ان تؤخذ فى الاعتبار تحت مفهوم ما بعد التأثير لبكتريا Bt (after effect) على الحشرات الكاملة للافات المستهدفة.

الكفاءة البيولوجية لبكتريا Bt ضد الممرضات انبائية:-

اجريت الاختبارات الاولى لبكتريا Bt ضد الزانثوموناس اوريزيا ، اورينيا كاروتوفورا ، بسيدوموناس سولانا سيريوم ، بيثيوم ديباريانيم ، سكلوروبيثوم رولفساي فى المعمل. اظهرت النتائج انه من بين ١٣٧ عزلة من Bt المختبرة اظهرت اربعة استجابة

موجبة ضد الممرضات البكتيرية الاربعة بينما اظهرت عشرة عزلات استجابة موجبة ضد الممرض الفطري *P.debaryanum* ولم يظهر اى من العزلات كفاءة ضد الاسكيريوشيوم. لقد وجد ٢-٣ عزلات *Bt* فعالة ضد بعض الممرضات البكتيرية. لقد لوحظ خفض فى الفعل والادار لبكتريا *B.t.* عندما استخدمت فى مرحلة النمو المسيليوس للفطر.

سمية بكتريا *Bt* ضد ديدان جوز الهند:

من بين ١٥٠ عزلة اختبرت اعطت العزلات HD-72, AO-97, HD-52, C-27, HD-595 فعل ابادى عالى ضد الحشرات. لقد كان HD-595 و C-27 اكثر سمية مع قيم LC50 تساوى ٢٦,٥٢ ، ٩٧,٤١ ملجم/لتر على التوالي. لقد كانت العزلتان اكثر سمية من الخلايا النقية من المستحضر التجارى. بوجه عام فان الاعراض التى حدثت على الحشرات المصابة كانت فى صورة توقف التغذية وفقد الالوان والشلل فى الحركة والموت والكسل. اليرقات الميتة تصبح بنية سوداء وحتى الاسود ثم تصبح متعفنة وهى نفس الصفات المعروفة للحشرات المعدية بهذه البكتريا.

فاعلية *B.t.* ضد الحشرات ذات الاهمية الطبية:

المكافحة الحيوية الاولى ليرقات البعوض فى الفلبين اجريت باستخدام انواع السمك مثل الجامبوزيا افينسيك وبويسيليا ريتيكيولاتا. الحاجة لتحسين وسائل المكافحة الحيوية ادت الى تحفيز البحوث نحو الطرق الحديثة. فى اتجاه البحث عن مركبات امنة وفعالة ضد اليرقات وجد ان بكتريا PG-14 لبكتريا *Bt* موريسونى (الطرز السيروولوجى : H8a 8b) عالية واختيارية السمية ومن ثم طورت. لقد تم عزل PG-14 من عينات التربة من قناه سيبوسيتى فى الفلبين (بادوا واخرين ١٩٨٢). هذه العزلة تنتج اجسام بللورية دائرية او غير منتظمة ذات سمية عالية ضد يرقات البعوض وليس ضد دودة الحرير والدافنيا الناضجة. لقد كانت هذه العزلة اول اكتشاف من المناطق الاستوائية وهى تختلف سيروولوجيا عن *Bt* تحت النوع اسرايلىنيسيز H-14.

سمية PG-14:

لقد وجد ان PG-14 ذات سمية عالية للعديد من انواع البعوض فى الفلبين. لقد اتضح ان درجة السمية تساوى ما تحدثه تحت النوع اسرايلىنيسيز على بعض انواع يرقات

البعوض. الببلورات المنقاه من PG-14 شديدة الشبة في السمية التي تحدثها السلالة الاسرائيلية كما تاكد من قيم LC50 والتي وصلت الى ٢,٩٧ ، ٣,٣٦ ميكروجرام/مليلتر على التوالي (Ibarra and Federici ١٩٨٦). التقييم الحيوى لمعقد الجراثيم والببلورات ضد بعوض انوفيليس ايجيبتي والكيوليكس موليسيش اظهر ان PG-14 كانت سامة مثل الاسرائيلية مع قيم LC50 ٠,٠٤٤ ، ٠,٠١٨ ، ٠,٥٢ ، ٠,٠٣٣ مللجم/لتر (باردو واخرون ١٩٨٤). لقد لوحظ من التطبيق الميداني للمستحضر PG-14 المحلى انه حقق خفض في التعداد ٩٠% (Padua ١٩٨٨).

التحديات التي تعترض استخدام بكتريا Bt في مكافحة الافات الحشرية: لقد اشار جبريل (١٩٦٨ ، ١٩٧٠) ان ادخال واستعمال التجهيزات التجارية لبكتريا B.t. خاصة ضد الفراشة ذات الظهر الماسي وهي من اكثر الافات اهمية التي تصيب الصليبية في البلد. منذ ذلك التاريخ تقبل الفلاحين استخدام هذه البكتريا ضد هذه الحشرة. لقد كان المنتج التجارى الاول الذى قدم فى الفلبين هو باسيليس ثورينجنسيز (الطرز السيروولوجى H-1) وبعد ذلك تحت النوع كورستاكي (الطرز السيروولوجى 3b : H3). لم يكن الاستخدام التجارى على مستوى كبير بسبب التكلفة العالية والتوفر فى الاسواق. تكلفة المنتج غير ثابتة وليس دائما متاحة لانه مستحضر مستورد. وجد كذلك ان الفاعلية متفاوتة. فى الدراسات المعملية اتضح ان اختلاف عدد المستعمرات مما يفسر النباتات فى السمية. هناك عامل اخر يجب ان يؤخذ فى الاعتبار وهو طول فترة شحن المنتج من امريكا وحتى بعد الاستخدام. عندما نتبعنا خطوات وصول المركب المستورد من بلد المنشأ وحتى الشركة المحلية وجدناها ستة اسابيع من امريكا حتى يصل الى ميناء الدخول. بعد ذلك يستغرق نقل المركب حتى يصل الى الشركة المحلية شهر او ستة اسابيع اخرى. لذلك فان الوقت الكلى الذى يستغرقه المركب من امريكا وهي بلد معتدلة المناخ حتى يصل للشركة فى البلدان الاستوائية من ٢-٣ شهور. بحلول الشهر الثانى او الثالث من تاريخ الشحن من امريكا فان معظم الخلايا يفترض ان تكون ماتت فعلا وان البروتين او الببلورات السامة تكون قد انهارت بالفعل.

لقد اضطلعت المعاهد العاملة فى مجالات بحوث وتطوير التكنولوجيا الحيوية بمهام الاستفادة من المواد المتوفرة محليا والاعتماد على المصادر الذاتية وتحقيق مبدأ الاكتفاء الذاتى مع التركيز على العمل على المبيدات الحشرية الميكروبية للاجابة على التحديات والاستفسارات التي وردت من قبل الزراع. بعد تطوير عزلة Bt لمكافحة يرقات البعوض

(PG-14 موريسونى والطرز السيروولوجى 8b : H8a) وثاقبة الذرة (LEP20 كورستاكى الطرز السيروولوجى 3b : H3a) تجسمت المشكلتفى الحاجة لاجهزة متقدمة للانتاج الكبير خاصة وحدات التخمر والطرز المركزى والمجففات الرشاشة. هذه الامكانيات مرتفعة التكاليف وتصبح اكثر تكلفة اذا كان السوق المحلى هو الهدف.

REFERENCES

- De Barjac, H. (1978). Un nouvelle variete de *Bacillus thuringiensis* tres toxique pour les moustiques : *Bacillus thuringiensis* subsp. *Israelensis* serotype 14. C.R. Acad. Sci. Paris Ser. D, 286, 797-800.
- Dulmage, H.D. and Cooperators. (1981). Insecticidal activity of the isolates of *Bacillus thuringiensis* and their potential use in pest control, 193-211. In : H.D. Burges (ed.), Microbial control of Pest and Plant Diseases, 1970-1980. Academic Press, London.
- Faust, R.M. and Bulla, L.A. Jr. (1982). Bacteria and their toxins as insecticides. Dekker, N.Y.
- Gabriel, B.P. (1968). Entomogenous microorganisms in the Philippines : new and past records. Philipp. Entomol., 1, 97-130.
- Gabriel, B.P. (1970). Additional record on the microbiota of Philippine insects. Philipp. Entomol., 1, 465-472.
- Goldberg, L.J. and Margalit, V.F. (1977). A bacterial spore demonstrating repid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti*, and *Culex pipiens*. Mosq. News, 37, 355-358.
- Heimpel, A.M. (1967). A critical review of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* and other crystalliferous bacteria. Ann. Rev. Entomol., 12, 287-233.
- Hermstadt, C. ; Soares, G.G. ; Wilcox, E.R. and Edwards, D.L. (1986). A new strain of *Bacillus thuringiensis* with activity against against coleopteran insects. Bio/Technolgt, 4, 305-308.
- Ibarra, J.E. and Federici, B.A. (1986). Parasporal bodies of *Bacillus thuringiensis* subsp. *Morrisoni* (PG-14) and *Bacillus thuringiensis* subsp. *Israelensis* are similar in protein composition and toxicity. FEMS Microbiol. Lett., 34, 79-84.

IRRI Highlights. (1986). *Bacillus thuringiensis* : an indigenous microbial pesticide, 16-17.

Krieg, A. ; Huger, A.M. ; Langenbruch, G.A. and Schnetter, W. (1983). *Bacillus thuringiensis* VAR. TENEBRIONIS : EIN NEUER, GEGENUBER Larven von Coleopteren wirksamer Pathotyp. Z. angew. Ent., 96, 500-508.

Lacey, L.A. and Singer , S. (1982). Larvicidal activity of new isolates of *Bacillus Sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* (H-1) against anopheline and culicine mosquitoes. Mosq. New, 42, 537-543.

Lacey, L.A. and Oldacre, S.L. (1983). The effect of temperature, larval age, and species of mosquito on the activity of an isolate of *Bacillus thuringiensis* var. darmstadiensis toxic for mosquito larvae Mosq. New, 43, 176-180.

Lacey, L.A. ; Lacey, C.M. and Padua, L.E. (1988). Host range and selected factors influencing the mosquito larvicidal activity of the PG-14 isolate of *Bacillus thuringiensis* var. morrisoni. J. Am. Mosq. Cont. Assoc., 3, 39-43.

Pacumbaba, E.P. and Padua, L.E. (1987). Screening of *Bacillus thuringiensis* isolates against coconut slug caterpillars (Lepidoptera: Limacodidae). Proc. 11th Internat. Cong. Plant Prot., Manila, Philippines.

Padua, L.E. (1988). Development of microbial pesticide for mosquito control in the Philippines. Proc. Coordination Workshop in Bacterial Control of Agricultural Insect Pests and Vectors of Human Diseases. Ein Gedi, Israel.

Padua, L.E. ; Ohba, M. and Aizawa, K. (1980). The isolates of *Bacillus thuringiensis* serotype 10 with a highly preferential toxicity to mosquito larvae. J. Invertebr. Pathol., 36, 180-186.

Padua, L.E. ; Ohba, M. and Aizawa, K. (1984). Isolation of a *Bacillus thuringiensis* (Serotype 8a : 8b) highly and selectively toxic against mosquito larvae. J. Invertebr. Pathol., 44, 12-17.

Padua, L.E. ; Ohba, M. and Aizawa, K. (1988). Comparative serology of crystals produced by PG-14. *Bacillus thuringiensis* subsp. Morrisoni (serotype H. 8a : 8b) and *Bacillus thuringiensis* subsp. Israelensis (serotype H-14). J. Invertebr. Pathol., 52, 192-194.

Padua, L.E. ; Gabriel, B.P. ; Aizawa, K. and Ohba, M. (1982). *Bacillus thuringiensis* isolated in the Philippines. Philipp. Entomol., 5, 199-208.

Padua, L.E. ; Ehora, R.V. and Moran, D.G. (1987a). Screening of *Bacillus thuringiensis* against Asiatic corn borer, *Ostrinia furnacalis* (Guenee) and diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.). Tech. Bull. No. 103. FETC, Taiwan, Rep. China, 1-7.

Padua, L.E. ; Wen, C.X. ; Lizhi, L. and Margalit, V.F. (1987b). The susceptibility of the lepidopterous pests of rice to *Bacillus thuringiensis*. Proc. 11th Internal. Cong. Plant., Manila, Philippines.

Undeen, A.H, and Nagel, W.L. (1978). The effect of *Bacillus thuringiensis* ONR-60A strain (Goldberg) on Simulium larvae in the laboratory. Mosq. News. 38. 524-527.

سادسا: تعريف وتنقية الاكسوتوكسينات الخارجية من تسعة سلالات من بكتريا باسيلليس ثورينجنسيز

فى مجال المنتجات الحيوية حدث تطور كبير فى مستحضرات الباسيلليس ثورينجنسيز Bt فى مختلف القطاعات الزراعية والصحية والصناعية وكذلك فى البحوث الاساسية. يمكن ان تستخدم B.t. على صورة الميكروب الشامل او الجراثيم او البروتين البلورى عن طريق السحق او الخلط مع البيئات المختلفة او بالتكامل فى النبات من خلال الهندسة الوراثية. يبدو ان هناك مشاكل مختلفة واجبة الحل لمواجهة التحديات العملية. كيف نحدد السمية فى المدى ومكان الفعل؟ - كيف يمكن ان تعرف عن التخصيصية وتحمل التوكسينات؟ - التنقية ومشكلة التنشيط بين مختلف المكونات؟ - اى التوكسينات تستخدم وكيف تستخدم؟ - اى السلالات تستخدم وبسهولة وبشكل متخصص؟

تمشيا مع محاولات الاجابة عن هذه الاسئلة بدأ دراسة المكونات المختلفة التى تنتج بواسطة بكتريا Bt وتقدير التراكيب المقابلة والناثير البيوكيميائى والفعل البيولوجى. هكذا قدم البحات فى تونس - معهد الكيمياء الحيوية بكلية العلوم التونسية السادة B.A.AFEF, 200 Ferid and B. Omr are

النتائج:

لقد استخدمت البتا-اكسوتوكسين B-exotoxin المنقاه بواسطة Debarjac and Dedonder (1968) كنموذج دراسة يركز على الاهتمام باستخدام البكتريا فى نفس المجالات الاساسية لتطبيقات المبيدات. من المعروف ان البتا-اكسوتوكسين كمشتق للادينوزين تراى فوسفات ATP يثبط تخليق الحامض النووى RNA ويعمل بوجه خاص على انزيمات البوليميرازيس RNA. استخدام الثلاثة السنظم الانزيمية RNA.Polymerases للخميرة ساكارومييسيز سيرمنيسيا والانزيم المنقى لبكتريا ايشيريشيا كولاي وجدت الحقائق التالية:

١. كل الانزيمات يمكن ان ينشط بواسطة التوكسين الخارجى "اكسوتوكسين".
٢. يعتمد معدل التنشيط الانزيمى على الانزيم. لقد وجد ان الانزيم الاكثر تنشيطا هو RNA بوليميز (A) حيث امكن الحصول على ٥٠% نشاط مع ٥ ميكروجرام/مليلتر بينما اختفى النشاط (صفر) مع تركيز ١٠ ميكروجرام/مليلتر.

الانزيم RNA . بوليميريز (B) اقل تثبيطا اما البوليميريز (٢) يثبط ببطئ كما

هو الحال مع RNA بوليميريز لبكتريا E. coli.

٣. فعل التوكسين الخارجى يعتمد على الصفيحة المستخدمة Template.

٤. بوجة عام وجد ان التثبيط من النوع التنافسى.

٥. وجدت نتائج مرتبة مع RNA بوليميريز (B).

عندما تم التعليم الاشعاعى للتوكسين الخارجى مع التريثيوم اعطى الكروماتوجرام الاشعاعى الذاتى autoradiochromatogram مركبات معلمة مختلفة. كذلك اظهر الكروماتوجرافى المعاوذ للتوكسين الخارجى على جهاز HPLC ذات الوسط المعكوس بالكربون المشع ك^{١٤}، نيوكلييتيدات مختلفة. البكتريا تخرج مركبات مختلفة. لقد تمت دراسة تسعة طرز سيروولوجية لبكتريا Bt للكشف عن مكونات النيوكلييتيرات التى اخرجتها البكتريا لمعرفة طرز الاخراج والفعل النسبى لكل مكون. لقد امكن الكشف عن خمسة مكونات ووجدت على درجة عالية من التنقية. لقد ثبت اخراج التوكسين الخارجى بيتا بواسطة التسعة طرز سيروولوجية المستخدمة والاخرى المسماه ١ ، ٢ ، ٤ ، ٥ تعتمد على الطرز السيروولوجى. المكون الخامس كان ينتج بواسطة الطرز T₇ ، T₉ وهو يثبط بوليميريز RNA مع معدل منخفض.

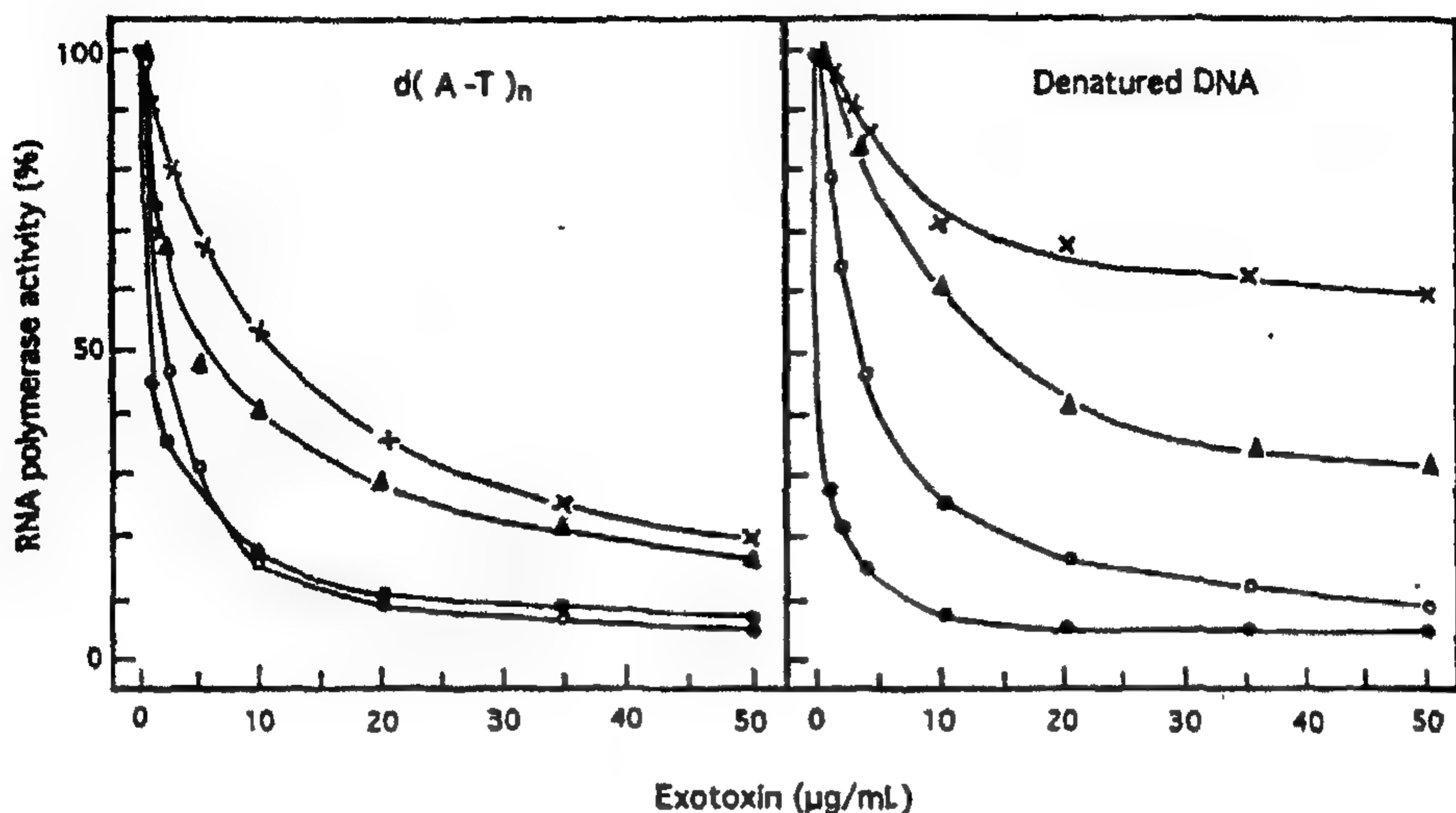
$K_i = 5,6. 10^{-6}M$ for RNA polymerase A of yeast.

$K_i = 20,4. 10^{-6}M$ for RNA polymerase of E. coli.

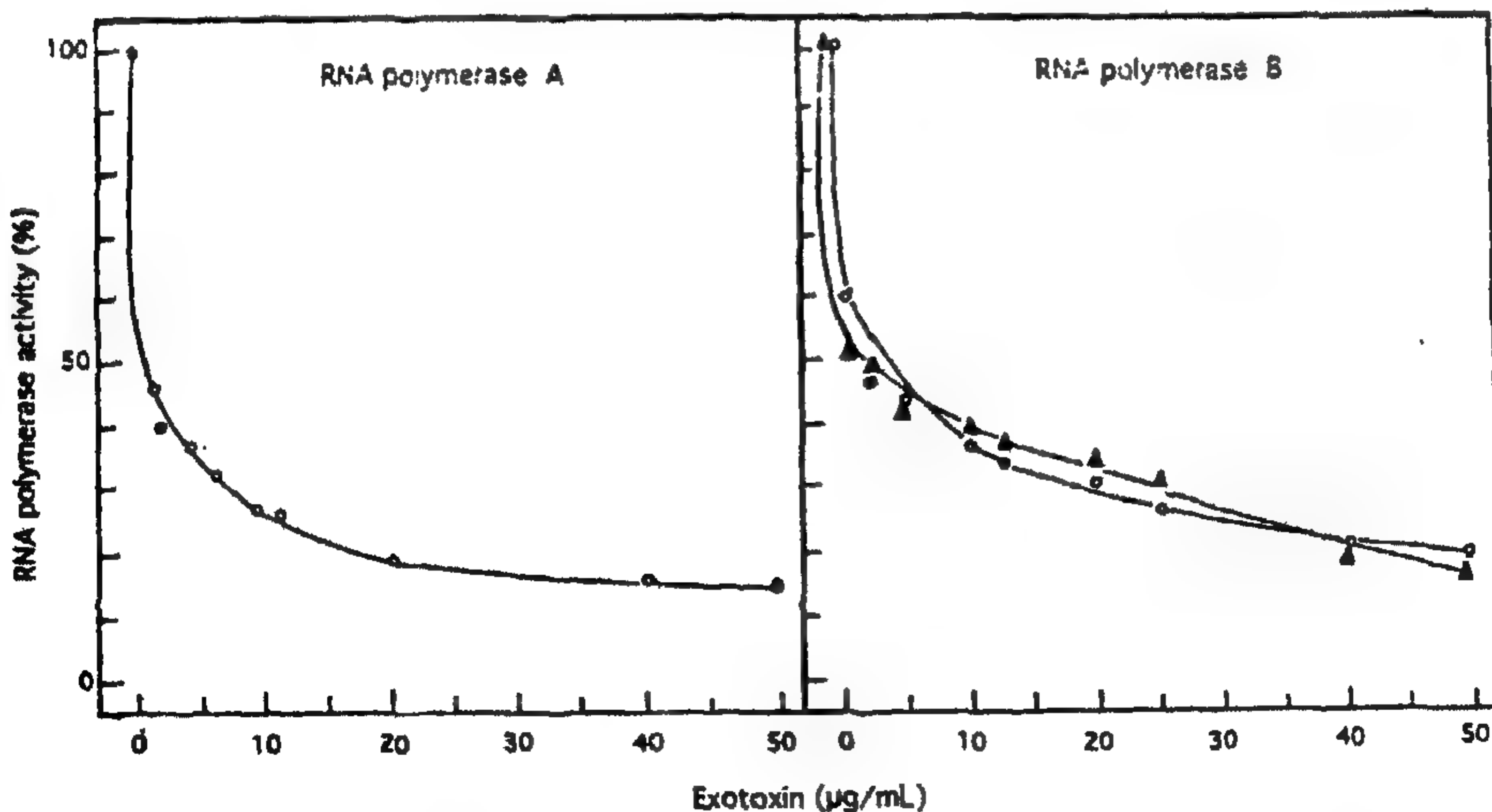
المكونات الثلاثة الاخرى لم يكن لها تاثير على RNA بوليميريز ولكنها سامة على النظام الحيوى المختبر مثل نمو الخميرة (مكون رقم ٤٠) وتطور اليرقات لحشرة ذبابة الفاكهة (المكونات ٢، ٣، ٥). لقد درس انتاج كل مكون تحت مختلف ظروف النمو واماكن التواجد. التنقية العالية للبيتا - اكسوتوكسين والتى تعطى منتج متجانس تسمح باجراء دراسات بيوكيميائية على النيوكلييد وموقع الفعل البيولوجى للبيتا-اكسوتوكسين تعمل على نشاط RNA بوليميريز حيث تثبط بداية النسخ فى الانزيم المعقد - الصفائح - الوسيط (جدول ٦-١٢) (الاشكال ٦-١٥ ، ١٦ ، ١٧) لقد ترشح فى اذهان كل العاملين فى مجال بكتريا Bt اهمية التوكسين الداخلى (الدلتا-اندوتوكسين) فى تحقيق الابداء على الحشرات وضرورة الحصول عليه فى نقاوة عالية مع خلو المستحضر من البيت-اكسوتوكسين ذات التأثيرات التوكسيكولوجية الخطيرة.

جدول (٦-٢١): انتاج النيوكليترات مع ٢ جم من الخلايا البكتيرية:

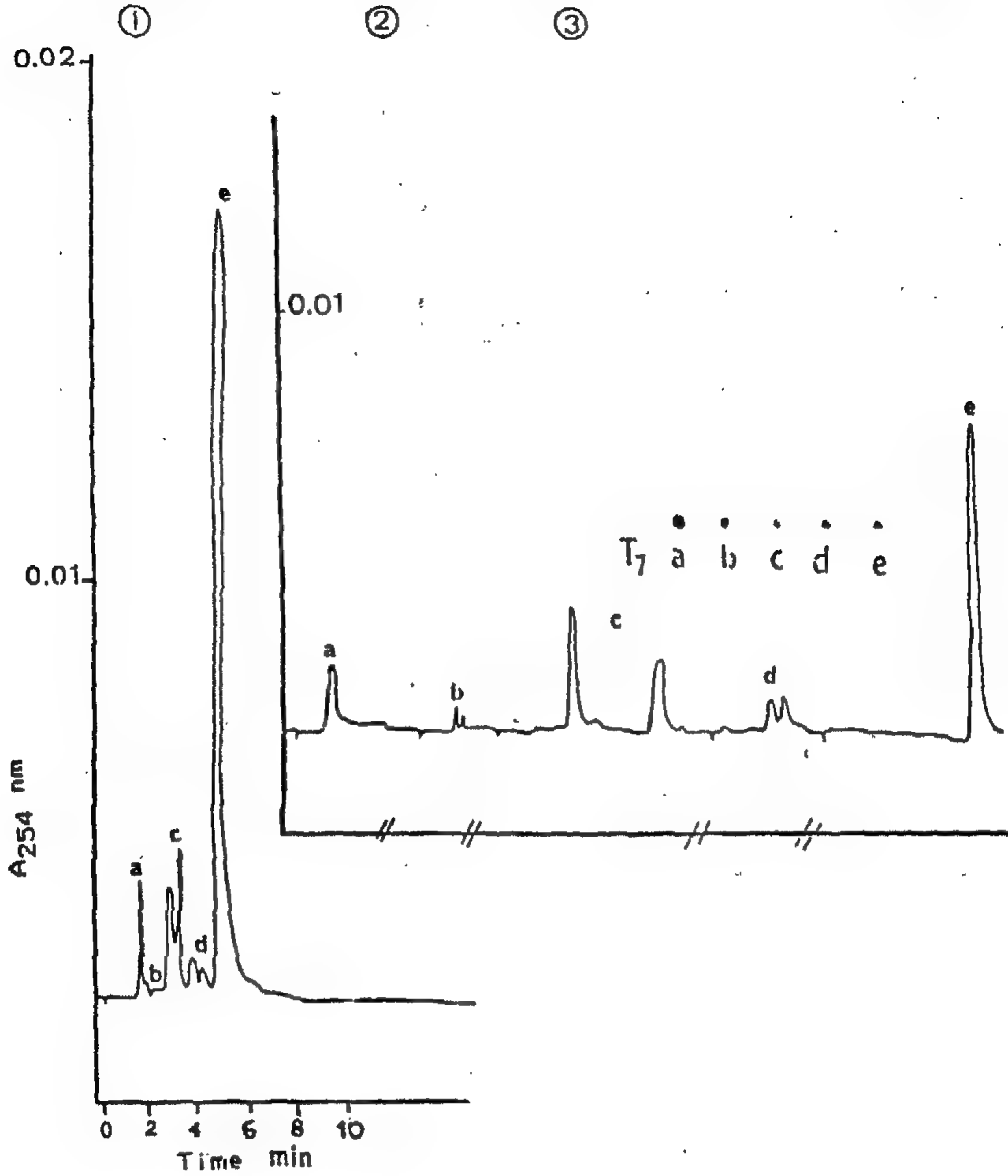
| السلالات | الاخراج الكلي | نيوكليتيات | انتاج النيوكليوتيد |
|-----------------|---------------|-------------|--------------------|
| T ₁ | 390 | No. 1 0.033 | 0.320 |
| | | No. 2 0.003 | 0.030 |
| | | No. 3 0.013 | 0.126 |
| | | No. 4 0.012 | 0.117 |
| T ₇ | 1000 | No. 1 0.044 | 1.100 |
| | | No. 2 0.010 | 0.270 |
| | | No. 3 0.039 | 0.987 |
| | | No. 4 0.070 | 0.765 |
| | | No. 5 0.230 | 5.750 |
| T ₉ | 1000 | No. 1 0.023 | 0.590 |
| | | No. 2 0.037 | 0.940 |
| | | No. 3 0.040 | 1.000 |
| | | No. 4 0.008 | 0.210 |
| | | No. 5 0.080 | 2.120 |
| T ₁₀ | 230 | No. 1 0.06 | 0.340 |
| | | No. 2 0.029 | 0.160 |
| | | No. 3 0.076 | 0.438 |
| T ₁₃ | 250 | No. 1 0.030 | 0.210 |
| | | No. 2 0.016 | 0.104 |
| | | No. 3 0.017 | 0.111 |
| | | No. 4 0.001 | 0.009 |
| T ₁₄ | 250 | No. 1 0.071 | 0.445 |
| | | No. 2 0.030 | 0.187 |
| | | No. 3 0.099 | 0.610 |
| | | No. 4 0.027 | 0.173 |
| T ₃₃ | 700 | No. 1 0.029 | 0.500 |
| | | No. 2 0.023 | 0.410 |
| | | No. 3 0.082 | 1.440 |
| | | No. 4 0.017 | 0.290 |
| T ₄₄ | 950 | No. 1 0.042 | 1.010 |
| | | No. 2 0.030 | 0.910 |
| | | No. 3 0.190 | 4.620 |
| | | No. 4 0.123 | 2.930 |
| T ₅₅ | 200 | No. 1 0.030 | 0.180 |
| | | No. 2 0.020 | 0.110 |
| | | No. 3 0.030 | 0.190 |
| | | No. 4 0.017 | 0.080 |



شكل (٦-١٥) : تأثير الاكسوتوكسين على نشاط بوليميريز الرنا RNA (o---) A
للخميرة والرنا في بوليميريز بكتريا E.coli (x---x) بعد B(*---*), C(^---^)



شكل (٦-١٦) : تأثير الاكسوتوكسين على تخليق الدانيوكلو تيد pAp U (o---o)
والتراي نيوكلو تيد Up Ap U (^---^)



شكل (٦-١٧): كروماتوجرامات جهاز الكروماتوجرافي السائل فائق المقدرة للبيئة النامية التي تم تحضين بكتريا Bt فيها على درجة حرارة ٣٠م لمدة ٧٢ ساعة.

— المستخلص الكلي للطرز السيرولوجي T7

— نيوكليتيدات مختلفة أزيلت على جهاز Hplc

— نظام TLC للمكونات المفصولة المختلفة.

سابعا: استخدام التكنولوجيا الحيوية فى مكافحة الافات باستخدام مستحضرات باسيلليس ثورينجنسيز

من مقالة للاستاذ الدكتور عادل مردان - كلية العلوم جامعة عين شمس - مصر .
استخدام الوسائل الحيوية فى مكافحة الافات معروفة ومورست منذ فترة طويلة. لقد استخدم الصينيون النمل الفرعونى فى مكافحة الافات فى مخازن الحبوب المخزونة لقد كانت تجلب طيور المياه Mynah الى موريشيوس عام ١٧٦٢ لمكافحة الجراد الاحمر كما استخدمت الكلاب وغيرها من الحيوانات الاخرى لمكافحة الحشرات والقوارض. القطط الليفة التى كان يعتقد انها من اول الوسائل فى مكافحة الحيوية لعبت دورا كبيرا فى مكافحة الفئران والتى كان انتشارها سببا فى انتشار طاعون البابونى فى اوربا فى العصور الوسطى كما كانت تأثيراتها على الكائنات غير المستهدفة غير متوقعة وفى هذه الازمنة لم تكن هناك اختبارات مطلوبة للتسجيل. استخدام الكائنات الدقيقة كمبيدات ظهر حديثا واثبت بعض النجاحات. فى الوقت الراهن يوجد عدد من انواع البكتريا والفطريات والفيروسات طرحت فى الاسواق كمبيدات تجارية بعد نجاح الانتاج وتجهيز المستحضرات. البكتريا من الوسائل الواعدة فى هذا الخصوص. لقد وصف اكثر من ٩٠ نوع من البكتريا تصيب الحشرات. معظم هذه الانواع تخص عائلات *Pseudomonad acea*, *Enterobacteriaceae*, *Bacillaceae*, *Micrococcaceae*, *Lactobacillaceae*. غالبية السلالات التجارية تنتمى الى الجنس *Bacillus* ومعظم المنتجات الواسعة الاستخدام جهزت من الباسيلليس ثورينجنسيز (B.t.) وفيها ما يزيد عن ٢٢ طرز سيروولوجى (يتميز بوجود الانتيجين السوطى). اعضاء هذه المجموعة سامة لحشرات حرشفية وثنائية وغمدية الاجنحة. لقد اكتشفت بكتريا B.t. فى ديدان الحرير فى اليابان فى بداية القرن العشرين. لقد انتج اول مركب تجارى فى فرنسا عام ١٩٣٥ وكان يعتمد على توكسين خطر على الانسان كذلك سمي البيتا-اكسوتوكسين. لقد تم تطوير طرق مختلفة لازالة هذا التوكسين من المنتج النهائى عن طريق تجهيز عملية التخمر. لقد قام Dulmage بعزل بكتريا Bt سلالة HD-1 وهى سلالة Bt كورستاكى خالية من التوكسين الخارجى والذى يمثل الان المادة الفعالة لمعظم السلالات التجارية من بكتريا Bt المستخدمة ضد حشرات حرشفية الاجنحة.

بالرغم من المعلومات المتوفرة عن كفاءة مستحضرات Bt تحت الظروف الحقلية الا انه مازالت هناك قيود لاستخدام المستحضرات البكتيرية الموجودة فى مكافحة اليرقات للعديد من الحشرات. من احد القيود الكبرى صعوبة اقناع رجالات الصناعة لتطوير

مستحضرات محسنة كاقتراب ثانی حيث ان سوق Bt مازال صغيرا حيث انه يمثل ما يزيد قليلا عن ٠,١% من السوق العالمی للمبيدات ولو ان هذه القيمة تمثل ما يزيد عن ٩٠% من كل مبيعات المبيدات الميكروبية. للتغلب على هذه الصعوبة الى جانب القيود الاخرى مثل قدرة الانتشار ، مثابرة وقوة البحث عن العائل ومعدل التضاعف ، العنف والثبات فى الحقل ، طرق وتكاليف الانتاج وكذلك مقاييس الامان الحيوى فان استخدام التكنولوجيا الحيوية لتطوير وسيلة مبشرة تعتمد على بكتريا Bt تبدو هي الحل. الهدف الحالى لاستخدام التكنولوجيا الحيوية توجيه المفاهيم العلمية والتكنولوجية مع التركيز على تطوير استراتيجيات للبيولوجيا الجزئية فى مكافحة الافات. لقد ادى نجاح استخدام العديد من التحضيرات الميكروبية ضد الافات المستهدفة الى تحفيز البحوث الفعالة فى اتجاه استخدام الكائنات الحية فى استراتيجيات الادارة المتكاملة للافات على المدى الطويل. الكائنات الميكروبية المهندسة وراثيا اصبحت فى المتناول كما تم تطوير تكنولوجيا جديدة للانتاج الكبير لهذه الميكروبات. لقد اصبحت من الممكن تخليق الجزئيات البيولوجية عن طريق زرع جينات خاصة فى مختلف انواع الكائنات الدقيقة. من اكثر الاستخدامات الملقية للنظر والاثارة فى اتجاهات الهندسة الوراثية ما تتمثل فى تصنيع توكسينات بكتريا Bt باستخدام البكتريا كمصانع. نواحى ومنظور استخدام طرق الهندسة الوراثية فى بحوث مكافحة الافات قد تبدا فى ثلاثة اتجاهات هي الحشرات والوسائل الميكروبية والنباتات العائلة.

١- الحشرات:- دراسة كيفية احداث الفعل على المستوى الجزيئى وفهم اسباب تخصصية التوكسينات على الحشرات المختبرة والعلاقات الخاصة بالتركيب والوظيفة وتمثيل التوكسين. تصميم الحصول على ممرضات ميكروبية فعالة تتطلب فهم كامل وواعى لكيفية احداث بكتريا Bt للفعل والتاثير وكذلك لتوضيح كيف تتداخل مع الحشرة المستهدفة والبيئة. من الامثلة الاخرى لنواحى المناورة بجين التوكسين الحشرى فى مكافحة الافات ما يضطلع بتقليل او منع تطور المقاومة تجاه المبيدات الحشرية البكتيرية وغيرها من الكيمائيات السامة. من المعروف جيدا ان الكائنات الحية تقاوم تاثيرات المواد السامة عن طريق منع التوكسينات من الوصول الى المواقع المستهدفة او بواسطة تحويل الموقع بما يحقق خفض حساسيته للتوكسين. تمثيل المواد السامة نعتبر من التقنيات الشائعة لمنع السم من الوصول الى الموقع المستهدف. العلماء فى

الوقت الراهن قادرون على كلونة الجين التي يتحكم في تخليق المقاومة في الحشرات ومن ثم مساعدتها في فهم كيفية عمل الجين.

٢- الممرضات الحشرية للباسيلليس (B.t.): Entomo pathogens

٢-١- المباشرة:

— البيولوجيا الجزيئية تقدم امكانية ليس فقط تحسين اداء هذه الممرضات الطبيعية بما يجعلها اكثر ملائمة مع اهدافها ولكن ايضا تحويل الميكروب غير الممرض الى ممرض مما يقدم اسلحة جديدة في الترسانة ضد الافات الحشرية. ان ادخال جينات توكسين B.t. في البكتريا E.coli سوف يخدم في الانتاج المكثف للتوكسين بالاضافة الى دراسة تداخل التوكسينات المختلفة ومكان احداث الطفرة من وجهة النظر الاكاديمية. نقل التوكسينات بين العوائل المختلفة المعتمدة على الباسيلليس سوف تقدم لنا خدمات افضل في الحقل ومن ثم يتحقق مدى واسع لبكتريا Bt في بكتريا قادرة على المعيشة والثبات وربما اعادة التدوير في البيئة. الامل معقود على رؤية حدوث تنشيط وتطوير أنشطة جديدة ضد اليرقات. استخدام نفس الهدف مع دمج البروتوبلاست قد يتطلب نظام للتقسيم (التسمية) للمواد المندمجة. يجب ان يكون في الازهان اننا لم نفهم بعد كل النقاط الخفية في توازن مجاميع الحشرات الى جانب المناورات المعملية. البحث عن سلالات جديدة خاصة في الدول الاستوائية او النامية يجب ان تستمر وتتواصل.

— لقد امكن تطوير وتحقيق تقدم في التقييم الحيوى للبلورات المختلفة باستخدام طرق زراعة الانسجة. خلايا انسجة الحشرات تعتبر من النظم الصالحة كنموذج لدراسة الاستجابة السامة للبروتين المنشط من بلورات بكتريا B.t. لقد تم كلونة جينات العديد من توكسينات Bt وتكرارها والتعبير عنها في البكتريا كما تم تعريف ادنى تتابع وراثي مطلوب لتشغيل بروتين التوكسين كامل الفاعلية. المسرح مهيا الان للهندسة الدقيقة لتوكسينات Bt اكثر كفاءة وفاعلية. لذلك فان الجرعات الاصغر يمكن ان تستخدم في الحقل لتقليل التكاليف العالية لاستخدام المركب في الوقت الراهن وتوسيع المدى العوائلى وتحقيق امان اكثر للكائنات الحية غير المستهدفة وتسهيل الانتاج التجارى وتحقيق الثبات المطلوب تحت الظروف الحقلية كذلك فان رجالات البيولوجيا الجزيئية يقومون بنقل جين توكسين Bt في

البسيدوموناس غير المرضية ومن ثم تحويلها الى وسيلة ميكروبية جديدة فعالة ضد حشرات حرشفية الاجنحة.

٢- غير مباشرة (الكلونة في وسائل تكافلية Symbiotic او غيرها:

— من الاقتراحات المفيدة والفعالة في اتجاه التطبيق الفعال بشكل اكبر لتوكسينات Bt ذات الفعل الابادي على الحشرات ما يتمثل في ادخال والتعبير عن جين التوكسين في خلايا الخميرة. يحدونا الامل في ان تكنولوجيا دمج DNA سوف تؤدي الى انتاج مواد سامة في البكتريا المناسبة قادرة على التغلب على كل مشاكل وعقبات الوسائل الموجودة حاليا في المكافحة الميكروبية مثل عدم الثبات تحت الظروف الحقلية وفقد النشاط الممرض بسبب التعرض للتشعيع. الدلتا-اندوتوكسين من السلالات البكتيرية المتخصصة ضد حشرات حرشفية الاجنحة تعتبر في الوقت الراهن من اكثر المبيدات الميكروبية التي درست بكثافة واختبرت على سلاسل كبيرة من انواع حرشفية الاجنحة. التقييم المناعي مع الاجسام المضادة عديدة واحادية الكلونة اوضح ان الببتيدات العديدة متميزة التراكيب للمعلم Mr 130-140 يمكن ان توجد في سلالة فردية. البروتينات تتحول من خلال التحلل المائي. مجسات DNA والبلازميد استخدمت لتوضيح ان الجينات التي تتحكم في تغليف وانتاج السبلورات تقع على عدد صغير من البلازميد ذات الوزن الجزيئي العالي. البروتين السام تم كلونته في بكتريا B.subtilis, E. coli وتم التعبير عنه حتى خلال مرحلة النمو الخضري.

— لقد امكن دمج او خلط البروتينات من السلالات المختلفة ومن ثم توسعت دائرة نشاط السلالة المندمجة. السلالات الجديدة كلية وجدت ذات فاعلية ضد مجاميع اضافية من الحشرات مثل غمدية الاجنحة المعدية بالبكتريا Tenebrionis B.t. والصنف سان ديغو. التعبير الاولي لهذه السلالة اشتملت على كلونة والتعبير عن جين التوكسين في بكتريا E. coli وقد خلص الباحثون الى ان تكنولوجيا مضاهي الوراثة الجزيئية يمكن ان تتواصل لتشمل الدنا التي تحتوى على انتاج النيوكلوئيد المشفر لبروتين التوكسين في بكتريا B.t. s.d. بهدف انتاج الجينات الجديدة التي يحسن من صفات النسيج والترجمة وتشفير البروتين بما يزيد من السمية او تغيير خصائصه المدى العوائلي. لقد امكن عزل العديد من الجينات للبروتين السام كما تم تحديد تتابع الحمض الاميني للموقع الفعال للبروتين من تتابع الدنا المتتابع للجين

وتحديد تركيب الببلورة . كيفية الفعل على المستوى الجزيئي لم يثبت بعد ولكن المستقبلات مثل الفوسفات تيديل كولين و ن - استيايل جالاكتوسامين قد تكون هي الموقع المستهدفة للتوكسين. لقد تمت الإشارة الى امكانية استخدام رسوم الحاسب الالى لعمل نموذج التداخل بين التوكسين والمستقبلات فى الحشرات والتي تؤدي الى التنبؤ بتركيب البروتين ذات الابداء على الحشرات. بعد موضة التركيب الثانوى والثلاثى للبروتين وصف الموقع الفعال وهذا يؤدي الى التعود على استخدام المبيدات الحشرية الحيوية. طرق التكنولوجيا الحيوية الجديدة قد تحدث اسهام من خلال زيادة الكفاءة عن طريق تحويل تكامل بلازميد البكتريا التى تكافح تخليق البروتين. هذا يقلل من تكلفة الانتاج ويحقق ويفتح مجال للمستحضرات الجديدة سهلة الاستخدام كبديل فان انتاج السلالات التى لا تكون الجراثيم asporogenic قد تقلل من تكاليف الانتاج عن طريق تفادى طاقة التمثيل الضائعة فى انتاج الجراثيم بجعل المنتج اكثر قبولاً فى بعض الدول.

— على المدى القصير قد يمكن تطوير منتجات تستهدف مواضع متخصصة اكثر. فى عام ١٩٨٥ نجحت شركة ساندوز فى الاختبار الحقلى لمركب جديد تحت الاسم Javelin وهو مبنى على سلالة NRD-12, a3A3B والتي اكتشفت بواسطة Norman Dubois فى شركة خدمات الغابات الامريكية. بالغرم من ان السلالة كانت قد اكتشفت وتم توصيف خصائصها وتأثيراتها المتزايدة ضد الفراشة العجورية فان التأثيرات المحسنة للجافليين كانت ضد دودة ورق القطن وهى افة تضر بالخضراوات وفى بعض البلدان التى تزرع القطن. بعض المنتجات الجديدة لمكافحة حشرات غمدية الاجنحة التى تتكون من السلالتين المذكورتين اعلاه وجدت مجالا فى الاسواق المختلفة خاصة لمكافحة خنفساء كلورادو البطاطس.

٢-٣- النباتات المحصولية Crop plants:

النباتات المهندسة وراثيا المقاومة للحشرات قد تشهد اليوم الذى يثبت فيه انها وتعتبر البديل الامن والرخيص لاستخدام الكيمائيات التوكسينية فى مكافحة الحشرات. ان تطوير ناقلات ذات اصغر بلازميد Ti يحتوى على معلومات منتخبة متعددة السيادة ومواقع مكلونة وكذلك محفزات او بادئات فعالة واسارات A العديد ذات تيار متدفق من اجر بكتيريوم تعول التحول النباتى. الطرق الاضافية تشمل الحقن الدقيق والتقييب الكهربى وتحفيز الجسم قد يجعل من الممكن تحقيق

التحول النباتي وهو غالبا ما يكون تحول اتجاه المقاومة بواسطة اقتراب الاجروباكتيريوم بالاضافة الى التحول هناك تحدى اخر يتمثل في ان نتعلم كيف يفيد تخليق نباتات ناضجة من الخلايا المتحولة او البروتوبلاست. في الوقت الحالي يوجد نماذج نباتية جيدة يمكن ان تستخدم لوضع استراتيجيات للهندسة الوراثية بغرض مكافحة الافات. الادخال الناجح لجينات توكسين بكتريا B.t. في الدخان تؤدي الى الحصول على نباتات عادية مقاومة لدودة قرون الدخان.

عامل الخطر في المبيدات الميكروبية المهندسة وراثيا Risk Facctor:

عند اختبار وتقييم الخطر المرتبط بهذه المبيدات يكون ممكنا تعريف مجموعة من العوامل العامة التي قد تساهم في حدوث الخطر. بسبب ان كل مركب ونظام استخدامات محددة ومميزة فان عوامل الخطر هذه يجب ان تؤخذ في الاعتبار على اساس كل حالة بمفردها Case-by-case basis. احتراماً للتشريعات والاختبارات المسبقة للمبيدات الميكروبية التي عرفت قبلا.

١. بسبب الطبيعة الاساسية الوراثية كمبيدات للافات فان هذه الكائنات مرجو منها ان تكون ذات نشاط بيولوجي. هذه المنتجات قد تكافح الافات عن طريق طرق مختلفة من الفعل مثل : القتل - احداث المرض - المنافسة او الاحلال - منع التغذية - تثبيط النمو - التأثيرات المعاكسة على التناسل. علاوة على ذلك فان الكائنات الدقيقة تصمم للاستخدامات البيئية والتي يمكن ان تستخدم على المحاصيل الغذائية والغابات او المراعى وكذلك في مكافحة ناقلات الامراض وبالقرب من اماكن السكنى. لذلك فان التعرض للكائنات غير المستهدفة والانسان قد يكون كبيرا.

٢. على خلاف المبيدات الكيميائية فان الميكروبات تعيش في الكون حيث تستمر في الحياه وتتضاعف. بمجرد ان تنطلق في البيئة فان المنع الكامل او المطلق لانتشارها يصبح غير ممكنا. لذلك فانه قبل اطلاق الميكروبات المهندسة وراثيا فان قدرتها على التكيف ويجاد اوساط بيئية جديدة او المقطرة على المنافسة مع غيرها من الكائنات الدقيقة في البيئة يجب ان تقيم بعناية. اي تقييم للتاثيرات البيئية يجب ان تؤخذ في الاعتبار من حيث المستويات المتوقعة لقواعد الكائن في البيئة بالاضافة الى نمذجة تمكن من التنبؤات العقلانية عن تاثير الظروف البيئية غير العادية وتأثيرها على الزيادات المحلية او الانفجار في مجموع الميكروبات.

٣. أى نظام اختبار لتوصيف الميكروبات المهندسة وراثيا أو تقييم تأثيراتها على أو التعرض للكائنات غير المستهدفة فى بيئة أو وسط جديد يمكن ان تؤدي الى نتائج غير متوقعة. لذلك فان السيناريو الايكولوجى لاي تطبيق مقترح للكائنات المهندسة وراثيا يجسب ان تقيم بعناية باستخدام الاقتراحات من فروع المعرفة المختلفة.

٤. بعض انواع الناقلات المهندسة وراثيا ذات احتمالات عالية للنقل الوراثى. مثال ذلك التحول مع مدى واسع من العوامل تعتبر من العناصر الوراثية للحركة الكروموسومية والتي تمكن من تسهيل النقل من كائن لآخر. هذا قد يؤدي مشكلتان: ادخال الجينات قد يعبر عنه فى انواع اخرى من الكائنات الدقيقة فى البيئة بالاضافة الى انه قد تنتج نسخ متضاعفة من الجين فى نوع ما من الكائنات الدقيقة مما يزيد من النشاط.

٥. بعض المبيدات الميكروبية المهندسة وراثيا قد تزيد من الفاعلية ضد الافة المستهدفة او قد تدخل نوعين من التوكسينات فى كائن واحد. حتى لو كان المدى العوائلى للكائن غير المهندس وراثيا وتأثيره على الحشرات النافعة معروف فانه من المفيد اعادة تقييم تأثيرات الكائن المهندس وراثيا من خلال التقييم الحيوى للمرضية واحداث العدوى فى الحشرات النافعة وغير المستهدفة.

٦. المبيد الميكروبي المهندس وراثيا الذى قد يتميز بدمج صفات متميزة معينة قد يكون قادرا على الثبات فى البيئة فى اوساط جديدة باعداد كافية تسبب تأثيرات معاكسة على الانواع غير المستهدفة.

٧. زيادة الثبات البيئى قد تمثل مشكلة تحت بعض الظروف. مثال ذلك ان جين توكسين بكتريا Bt يمكن ان يغرس فى مستقبل طويل الدوام او سهل التضاعف او فى العائل المناسب مثل الطحلب الاخضر المزرق. هذا قد يكون مطلوبا لزيادة فترة الحياه وتشير توكسين Bt ليرقات البعوض ولكن قد يؤدي الى مشاكل غير متوقعة خاصة اذا كانت السلالة المهندسة وراثيا ليست محدودة فى التخصصية على الافة المستهدفة.

٨. مع الاستخدام العريضة وبعد ان توفى الوسيلة الميكروبية المهندسة وراثيا كل اختبارات الامان فان الافة المستهدفة قد تكون سلالات مقاومة للتوكسينات

الميكروبية للدرجة التى تكون عندها ثابتة لفترات طويلة او تسمى وجودها فى البيئة لمستويات عالية.

التوصيات: لتطويع طرق لتقييم وتقليل الخطر من ادخال الكائنات المهندسة وراثيا ضد اليرقات فى البيئة يمكن اتباع الاعتبارات التالية:

١- بالاضافة الى الدلائل الموجودة عن اختبارات امان الوسائل الميكروبية فى مكافحة الافات فانه يجب تطوير طرق واقتربات قياسية على خطوات تمكن من اختبار الكفاءة والاماكن للكائنات الدقيقة المهندسة وراثيا من المعمل الى الحقل الاختبارات التى تتعدى نطاق المعمل يجب ان تتحرك تباعا فى اتجاه: ١- كائنات دقيقة متشابهة ، ٢- صوب زجاجة او عزف نمو ، ٣- تقييم حقلى محدود ومقيد.

٢- المنتج المهندس وراثيا يجب ان يعرف بدقة ويختار وينتخب بناء على الصفات المطلوبة بما يسمح بالتقييم المناسب للتاثيرات الايكولوجية.

٣- اختبار الجودة للسلاسل المهندسة وراثيا يجب ان تتطور بشكل جيد. فى الكائنات الدقيقة التى طورت للتطبيقات البيئية فان مقدرة وكفاءة الانجراف الوراثى يجب ان تمنع او تحجم للدرجة المقبولة تقنيا وفتيا. الوسائل الوراثية المنقولة يجب ان تكون غير متحركة وكما لوحظ قبلا فان ميكانيكيات الحفظ او التحطيم الذاتى يجب ان تهندس فى المبيدات الميكروبية المندمة.

ثامنا: استخدام الباسيليس ثورينجنسيس في وقاية النباتات في مصر مع تأكيد

Costraints

في مقالة للدكتور F.N.Zaki بقسم الافات ووقاية النبات بالمركز القومي للبحوث - الدقى - القاهرة-مصر. الاستخدام الناجح للباسيليس ثورينجنسيس (B.t.) في مكافحة الحشرات من رتبة حرشفية الاجنحة مثل دودة ورق القطن والدودة القارضة ودودة القطن الصغرى تكرر تحت الظروف التجريبية الميدانية في مصر. في كل التجارب التى اجريت بواسطة الدكتور سلامة ومعاونوه كان يضاف المولاس لمعلقات Bt كي تحقق الانتشار والالتصاق بمعدل ٤ لتر/فدان. مع الرشاشات الظهرية و ٥٠٠-٦٠٠ لتر ماء/فدان مع موتورات الرش الارضية. كان الرش يجرى دائما قبل غروب الشمس لتفادى تأثير الاشعة فوق البنفسجية خلال النهار وكذلك لاعطاء اليرقات فرصة للتغذية على الاوراق المرشوشة طول الليل. كان يضاف واحد كيلوجرام من كربونات الكالسيوم او اكسيد الكالسيوم لمحلول الرش مع كل فدان لزيادة فعالية B.t. (سلامة وآخرون ١٩٨٥ ، ١٩٨٦ ، ١٩٨٩). لاستخدام الطعوم ضد الدودة القارضة فان الكمية المطلوبة من الديبيل Dipel مع او المواد الاضافية كانت تضاف للمولاس (٤ لتر/فدان) وردة القمح (٢٥ كجم/فدان) مع التسهيل بالماء. كان يتم خلط المكونات بتجانس للتأكد من تجانس توزيع المواد الفعالة في الطعوم قبل نشرها بين بادرات النباتات. كانت الطعوم تجهز مباشرة قبل التطبيقات الحقلية. في التجارب الحقلية الموسعة كان يضاف واحد كيلوجرام من كربونات الكالسيوم او اكسيد الكالسيوم (سلامة وآخرون ١٩٨٩).

كفاءة مستحضرات Bt في خفض مجاميع حشرات ابي دقيق الكرنب مع الاصناف المختلفة من الكرنب في مصر تم تقييمها بواسطة سلامة ومعاونوه ١٩٩١. عندما استخدم المنتج التجارى Dipel-2x (Bt من الصنف كورستاكي HD-1) كمسحوق تعفير سجل افضل النتائج في مكافحة ابي دقيق الكرنب التى تصيب الكرنب الشتوى. لقد تحقق مكافحة فعالة مع رشة او رشتان من الديبيل X2 بمعدل ٢٠٠ جم/فدان او ٣ رشات على فترات اسبوعية بمعدل ١٠٠ جم/فدان وانكن حماية الكرنب من هجوم الحشرة. لقد كانت انتاجية الفدان من رؤوس الكرنب للتسويق من الحقول المعاملة بالديبيل X2 مساحية للانتاجية من الحقول التى عوملت بالمبيدات الحشرية الكيميائية مثل اللانيت او الجاردونا. لقد وجد سلامة وآخرون ان معدل الاستخدام الفعال للديبيل X2 لمكافحة الدودة القارضة على بعض الخضراوات كان ٢٥٠ جم/فدان . اضافة بعض المضافات الكيميائية مثل كبريتات الكالسيوم او اكسيد الكالسيوم ادى الى زيادة معنوية في فعالية الديبيل X2 على مجاميع

اليرقات. لقد وجد ان اضافة كربونات الكالسيوم او كبريتات الزنك للديبيل X2 ادى الى خفض كبير فى مجموع اليرقات مما نتج عنه زيادة كبيرة فى المحصول لبعض الخضراوات. طعوم 2x-Dipel بمعدل ٢٥٠ جم/فدان كانت اكثر فاعلية على نفس القدر مع المبيدات الحشرية الكيميائية (هو ستاينون) عندما استخدمت بمعدل ١,٥ لتر/فدان .

لقد اجريت تجارب لتقييم تأثير مستحضرين تجارين من بكتريا Bt هما (ديبيل وثوروسيد) على مجموع فراشة ورنات البطاطس فى حقول البطاطس بالمقارنة مع مبيد السيفين والجوزاينون. معاملات الديبيل وثوروسيد وكذلك الجوزاينون كانت مقالة فى خفض الاصابة بالفراشة مما ادى الى زيادة فى الانتاجية وتحقيق محصول عالى (صيدر والشريف ١٩٨٧). فى عام ١٩٨١ وجد الحسينى ان المعاملة بالباكتوسبين فى حقول البرسيم كانت فعالة ضد دودة ورق القطن بدون اى فاعلية على المفترسات الموجودة بينما ادت معالجات النوفاكرون الى خفض مقدار الافة والحشرات النافعة. اليرقات التى كانت تعيش لاكثر من ١٠ ايام كانت تعاني من تاخير النمو.

التجارب الحقلية:

فى عام ١٩٩٠ استخدمت مستحضرات البكتريا المستوردة مثل ديبيل 2x مسحوق قابل للبلل (٣٢٠٠٠ وحدة دولية) ، ديبيل ES معلق قابل للاستحلاب (١٧٦٠٠ وحدة دولية) والمستحضر المحلى Bt من الصنف entomocidus فى مساحة ٧٠ فدان مزروعة بالقطن ضد الدودة القارضة كطعم ورش ضد دودة القطن ، دودة اللوز القرنفلى وكذلك الشوكة. لقد وصلت نسبة الخفض فى مقدار الدودة القارضة ٩٨% وهى ماتت مع المبيد الحشرى هو ستاينون. لقد تراوحت نسبة الموت فى دودة ورق القطن من ٥٧ وحتى ٧١% مع المستحضرات المختلفة من بكتريا الباسيلليس B.t. لقد كانت نسبة الاصابة بدوتى اللوز ١٦ ، ٢١ ، ٦٥% فى المساحات التى عوملت ببكتريا Bt ثم المبيد ثم المقارنة على التوالى. لم يظهر المحصول الناتج اختلاف معنوى بين المساحات المعالجة ببكتريا Bt والمبيدات. فى نفس الموسم استخدمت Bt ضد الدودة القارضة ودودة ورق القطن فى مساحة ٦٠ فدان مزروعة بفول الصويا. لقد حدث خفض يزيد عن ٩٠% فى مجموع الدودة القارضة المناطق المعاملة ببكتريا Bt فى مقابل ٨٢,٧-٩١,٣% خفضة فى مقدار دودة ورق القطن مع المعاملة ببكتريا Bt بينما احدثت المعاملة بالمبيدات الكيميائية خفض ٩٥,٧% فى التعداد. لقد زاد المحصول مع اجراء رشتان من بكتريا Bt ضد دودة ورق القطن.

فى عام ١٩٩١ اجريت تجربتان بواسطة سلامة ومعاونوه فى حقول القطن وفول الصويا باستخدام بكتريا Bt لقد تم رش مساحة ٢٨ فدان مزروعة بالقطن فى محافظة الدقهلية بمركب ديبيل x2 ضد دودة ورق القطن مع معدل ٧٥٠ جم/فدان. كذلك تم رش فدان قطن بالمركب المحلى Bt من الصنف entomocidus. اجريت ثلاثة رشات كل اسبوعان مرة. فى الفيوم تم رش ٢٨ فدان قطن بمركب ديبيل ٨ الى (١٧٦٠٠ وحدة دولية) بمعدل ٧٥٠ مليلتر/فدان ضد ديدان اللوز. فى هذه المساحة تم اجراء ٣-٥ رشات وقورنت النتائج بالمبيدات الكيميائية. فى محافظة المنوفية تم رش مساحة ١٥ فدان مزروعة بفول الصويا مرة او مرتان بمركب ديبيل x2 ضد دودة القطن. اظهرت النتائج ان نسب الموت فى دودة ورق القطن فى التجربة الاولى كانت ١٠٠ ، ٩٥ ، ٨٠ % مع الرشات الاولى والثانية والثالثة على القطن على التوالي. لقد كان محصول القطن فى هذه التجربة اعلى حصة فى المساحات الاخرى حيث تم جمع لطع دودة ورق القطن يدويا . لقد وجد ان ٤ او ٥ رشات ادت الى خفض بدير ان اللوز بالمقارنة بالمساحات التى عوملت بالمبيدات الحشرية كما كان المحصول اعلى. اظهرت تجارب فول الصويا ان نسبة الموت فى المساحات المعالجة ببكتريا Bt كانت اقل منها فى المساحات المألجة باللانيت. لقد تم تسجيل اختلافات غير معنوية فى المحصول فى المساحات التى عوملت مرتان ببكتريا Bt وتلك التى عوملت باللانيت.

الثبات فى الحقل Persistence in the field:

الثبات القليل لبكتريا Bt فى الحقل يمثل المشكلة الكبرى التى تعيق استخدامها بشكل فعال فى مكافحة الافات. فى عام ١٩٨٣ قام سلامة ومعاونوه بداسة ثبات المستحضرات المختلفة من جراثيم Bt بعد رش زراعات القطن فى مصر. لقد وجد الباحث خفض ملحوظ بعد يوم واحد من الرش وكان الانحدار فى حيوية الجراثيم يتقدم بمرور وقت التعرض فى الحقل. لقد تراوحت نصف فترة حياه الجراثيم لمستحضرات بكتريا Bt المختبرة ما بين ٧٥ وحتى ٢٥٦ ساعة ولم تمكن الباحث من ايجاد علاقة بين هذا المعيار ودرجات الحرارة على سطح اوراق القطن المعرضة للشمس. يبدو ان الاشعة فوق البنفسجية هى العامل الاساسى الذى يؤثر على حيوية الجراثيم. لقد اجرى قياس لحيوية جراثيم مستحضرات بكتريا Bt على فترات مختلفة بعد الرش فى زراعات القطن خلال موسمى ٨٠ ، ١٩٨١. لقد قام سلامة وزكى (١٩٨٥) بتقدير موت اليرقات الصغيرة من دودة ورق القطن وعلاقتها بالقياس الحلقى ومايستتبعه من هدم فى جراثيم Bt فى

المستحضرات على اوراق نباتات القطن. لقد وجد ان المستحضرات المختلفة من Bt تختلف في درجة الحماية من ضوء الشمس وكانت كفاءتها غير ثابتة في بعض الاحيان لقد وجد ان انحدار حيوية الجراثيم كان يتناسب طرديا مع موت اليرقات وهذا لا يعنى بالضرورة ان السمية على الحشرات ترتبط فقط بحيوية الجراثيم. لقد اتضح ان ضوء الشمس هو العامل الاكبر والاساسي الذي يؤثر على حيوية الجراثيم. لقد ذكر الباحث ان استخدام المواد الاضافية او منشطات التغذية مثل الكواكي او مستخلصات اوراق نباتات القطن او لب الجناري أدت الى زيادة الفاعلية لمستحضرات Bt على دودة ورق القطن بدرجة تعرض النقص الذي تحدثه انهيار الجراثيم عن طريق زيادة التناول وتحقيق زيادة الموت ولكنها لا تعمل كواقبات من الاعتبار بواسطة ضوء الشمس.

مخاليط بكتريا الباسيليس Bt مع المبيدات الحشرية الكيميائية:

في استخدام مخاليط المبيدات الحيوية والكيميائية تعتمد على التوافق فيما بينها "Compatibility". في عام ١٩٨٤ قام سلامة ومعاونوه بدراسة تأثير بعض المبيدات الحشرية المختارة على تجرثم بكتريا Bt من الصنف entomocidus وتأثير مخاليطها على دودة ورق القطن اظهرت النتائج ان من بين الكربامات المختبرة كان الكارباميل اكثرها ضررا على عملية تجرثم Bt عن الميثونيل داخل المبيدات الفوسفورية احدث التوكسين تثبيط في التجرثم اقل مما يحدث البروفينوفوس مجموعة البيرثريودز التي تمثلها الفينثاليرات والسيبرمثرين والبيرثرين اظهرت تأثيرات ضارة اقل على تجرثم Bt بالمقارنة بالمجاميع الاخرى . لقد وجد نفس الباحث ان البيرثريودز ومعظم المبيدات الفوسفورية العضوية المختبرة احدثت تقوية في فاعلية بكتريا Bt التي استخدمت ضد دودة ورق القطن. لقد وجدوا ان الكربامات والدايفلو بنزيرون ومخلوط الميثوميل والدايفلو بنزيرون ذات تأثير اضافي عندما استخدمتا مع سلالات بكتريا Bt . التأثير البسيط للبيرثريودز على عملية التجرثم للبكتريا Bt بالمقارنة بما احدثه الاقسام الاخرى من المبيدات الحشرية ادى الى الاقتراح بحدوث قليل من التداخل او عدم حدوثه مع ايكولوجية ودوام هذه البكتريا النافعة على مكان احداث الفعل. التداخلات التنشيطية أدت الى الاقتراح بان استخدام البيرثريودز مع Bt قد تكون وسيلة امنة وفعالة في مكافحة دودة ورق القطن. لقد اجريت دراسات عن تأثير مخاليط الجرعات تحت القاتلة من فيروس البولي هيدروسيز الفوري وبكتريا Bt على العمر الثاني ليرقات دودة ورق القطن (سلامة

واخرون ١٩٨٧). لقد اظهر التقييم الحيوى ان كفاءة Bt من الصنف entomocidus HD-635 كانت اعلى من Bt الصنف جاليرى HD-129 مخاليط SLNPV, Bt HD-129 اظهرت تأثير تضاد بينما مخاليط SLNPV, Bt HD-635 اظهرت تأثيرات اضافية. الجرعة النصفية (LD50) لاصناف Bt تتاقت مع زيادة جرعة الفيروس فى المخلوط. الاستخدام المتزامن لفيروس SLNPV وبكتريا Bt خاصة مع التركيزات المنخفضة التى اظهرت تأثير اضافى على يرقات دودة ورق القطن قد تكون مفيدة وفعالة فى مكافحة هذه الافة الضارة.

REFERENCES

El-Husseini, M.M. (1981). New approach to control the cotton leafworm, *Spodoptera littoralis* by *Bacillus thuringiensis* in clover fields. Bull ent. Soc. Egypt. Econ. Ser., 12 , 1-6.

Haydar, M.F. and El-Sherif, L.S. (1987). Microbial control of the potato tuber worm, *phthorimiae operculella* in the field. Bull. Ent. Soc. Egypt. Econ ser., 16, 127-132.

Salama, H.S. ; Matter, M. ; Zaki, F.N. and Salem, S. (1991). Field evaluation of *Bacillus thuringiensis* for control of *pieris rapae* on two varieties of cabbage in Egypt. Discovery and Innovation, 3 (1), 71-76.

Salama, H.S. and Zaki, F.N. (1991). Utilization of *Bacillus thuringiensis* to control the cotton leafworm in cotton and soybean and the bollworms in cotton in Dakahlia, Fayoum and Menofia governorates, Report from N.R.C., Cairo.

Salama, H.S. ; Salem, S. ; Zaki, F.N. and Matter, M. (1990). Control of *Agrotis ypsilon* on some vegetable crops in Egypt using the microbial agent *Bacillus thuringiensis* anz. Schadlingskde, pflanzenschutz, umweltschutz, 63, 147-151.

Salama, H.S. ; Moawad, S.M. and Zaki, F.N. (1987). Effects of nuclear polyhedrosis virus, *Bacillus thuringiensis* combinations on *spodoptera littoralis*. J. Appl. Ent., 104, 23-27.

Salama, H.S. and Zaki, F.N. (1985). Application of *Bacillus thuringiensis* and its potency for the control of *spodoptera littoralis*. Z. ang. Ent., 99, 425-431.

Salama, H.S. ; Foda, M.S. ; Zaki, F.N. and Moawad, S. (1984). Potency of combinations of *Bacillus thuringiensis* and chemical insecticides on *spodoptera littoralis*. J. Econ. Entomol., 77, 885-890.

Salama, H.S. ; Foda, M.S. ; Zaki, F.N. and Khalafallah, A. (1983). Persistence of *Bacillus thuringiensis* spores in cotton cultivations. Z. ang. Ent., 95, 321-326.

تاسعا: قبول الفلاحين لتطبيقات مكافحة الميكروبية فى مصر

من مقالة للدكتور S.A.Salem بالمركز القومى للبحوث - مصر حيث العنوان مثير وهام. لقد قدم سيلدنة للمقالة بانه من بين الانشطة الهامة فى المجال الزراعى فى مصر اختلاف الانتاج الغذائى مكانا هاما يتم ضرورة زيادة بما يتلائم مع الزيادة السكانية الرهينة وبما يحقق الامن الغذائى للمريين. من التحديات التى تعرض هذا السبيل فقد الرهيب الذى تسببه الاصابة بالافات فى الزراعات المختلفة قبل الحصاد وكذلك العقد الذى يحدث بعد الحصاد واثناء التخزين. لقد تم تطوير طرق مختلفة من بينها استخدام المبيدات الكيميائية فى الزراعة فى مصر لاضرار التى تحدثها المبيدات على البيئة والانسان والحيوان معرفة تماما لذاك فان التغيير فى اتجاه استخدام الوسائل الحيوية او نظم الادارة المتكاملة للافات تلقى القبول والتشجيع فى هذا المقام فان تطور وسائل مكافحة الميكروبية خاصة الباسيلليس ثورينجنسيز كى تستخدم على نطاق واسع ضد بعض الافات الحشرية من حرشفية الاجنحة لاقت الكثير من الاهتمام خلال السنوات العشر الاخيرة من قبل البحوث فى المركز القومى للبحوث وغيره من المعاهد البحثية والجامعات المصرية لقد اجريت سلاسل من التجارب الحقلية الواسعة باستخدام الباسيلليس ثورينجنسيز ضد اخطر الافات الحشرية التى تهاجم محاصيل القطن وفول الصويا وغيرها من المحاصيل الزيتية. لقد تمت مقارنة النتائج مع تلك المحصل عليها مع المبيدات الحشرية الكيميائية.

اظهرت الدراسة ان الفلاحين فى مختلف محافظات مصر على دراسة كاملة بالاهمية الكبرى للافات الحشرية التابعة لرتبة حرشفية الاجنحة مثل دودة ورق القطن وديدان اللوز. كذلك هناك قناعة كاملة لدى الفلاحين عن الاخطار الكبيرة التى تحدثها المبيدات على الجانب الاخر اتضح ضالة وقلة المعلومات عن اقترابات مكافحة الحيوية باستثناء بعض نواحي المعرفة عن بعض انواع الطيور التى تقترب الافات. لقد كان هذا نفس الوضع فى العديد من الدول الافريقية (Saxena وآخرون ١٩٨٩). لقد ادى استخدام مستحضرات Bt على المحاصيل المختلفة الى نجاحات كبيرة. لقد اجريت العديد من التجارب الميدانية لثلاثة سنوات متتالية وكانت مشاركة الفلاحين من البداية وحتى الحصاد هامة لخلق الثقة فى هذا الاقتراب. فى السنة الاولى كان هناك خوف لدى الفلاحين من استخدام Bt بسبب عدم تحقيق النقل الفورى كما هو الحال مع المبيدات الكيميائية وبعد ذلك وفى السنوات التالية تغير المفهوم وتولد القبول لدرجة اصبح الفلاحون يفضلون الوسائل الحيوية بدلا من المبيدات.

REFERENCES

Sexena, K.N. ; Pala Okeyo, A. ; Seshu Reddy, K. ; Emolo, E. and Ngode, L. (1989). Insect pest management and socio-economic circumstances of small Insect Sci. Applic., 10 (4), 443-462.

Salama, H.S. (1984). Bacillus thuringiensis Berliner and its role as a biological control agent Z. ang. Ent., 98, 206-220.

Salama, H.S. and Zaki, F. (1985). Application of Bacillus thuringiensis for the control of spodoptera littoralis. Z. ang. Ent., 99 (4), 425-431.

Salama, H.S. ; Foda, M.S. and Sharaby, A. (1989). Potentiation of Bacillus thuringiensis andotoxin against he greasy cutworm agrotis ypsilon Z. ang. Ent., 108. 372-380.

عاشرا: خصائص تمثيل الباسيلليس ثورينجنسيز خلال التخمر المغمور

من مقالة Xie Tianjian, Ma Tianlian, Xie Xinzhu and yang ziwen من اكااديمية هيونى للعلوم الزراعية وكلية التكنولوجيا الكيميائية فى شرق الصين. لقد قدم البحوث للمقالة بان الباسيلليس ثورينجنسيز (B.t.) تعتبر مبيد امن للانسان والحيوان ولايلوث البيئة او يحدث ضرر للاعداء الطبيعية. لقد اجريت العديد من الابحاث والدراسات على انتاج واستخدام بكتريا B.t. فى الصين تم تطوير عملية التخمر المغمور للانتاج الواسع على المدى الطويل لقد استخدمت بيئة ذات تركيز منخفض فى البداية مع عد جراثيم $10 \times 2,5$ جراثيم / مليلتر. لقد حدث تطور كبير مع تحسين فى تكوين البيئة وعملية التخمر. لقد تم تقدير العديد من المعايير خلال مراحل النمو المختلفة لبكتريا Bt وتم تحليل العلاقات الخاصة بها على النحو التالى:

(١) مجموع الخلايا والمحتوى الكلى من الحمض الكلى من الحمض النووى CAN

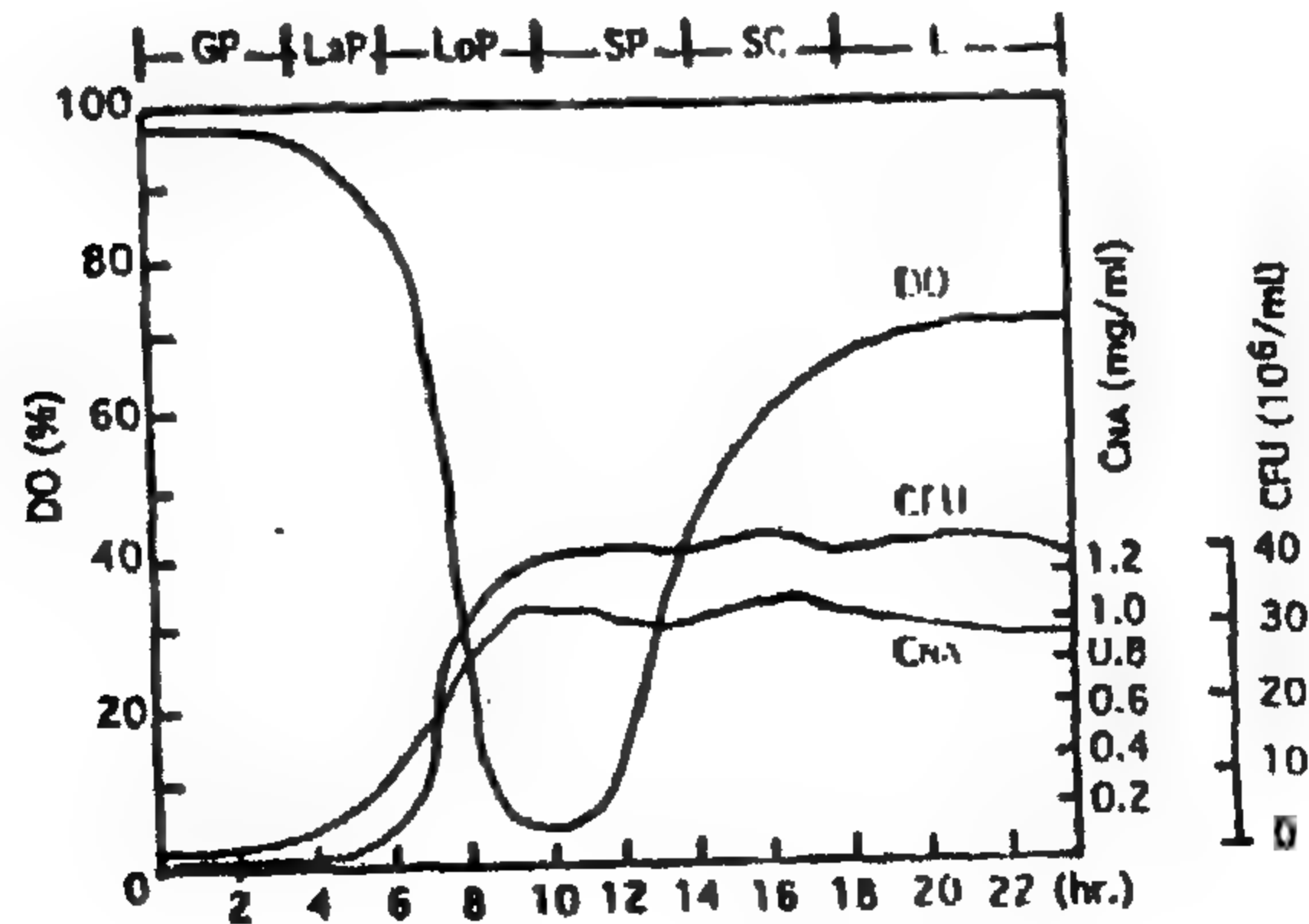
والاكسجين المذاب DO

اظهرت النتائج ان نظام محتوى الحامض النووى كان متساويا مع نظام نمو بكتريا Bt (الشكل ٦-١٨). لقد تاكد انه من العقلانية استخدام CNA للتعبير وعكس ما يحدث فى مجموع الخلايا. لقد استخدمت الجراثيم مباشرة فى احداث العدوى. خلال الفترة من البداية الى الصفر وحتى اربعة ساعات حدث تطور للانوسبورات (للجراثيم الداخلية) الى الخلايا الخضرية. لقد كانت CNA وعد الحيوية من بين المستويات المختلفة. الخلايا التى حدث فيها تمثيل لا تنقسم وفى الغالب لم يلاحظ تنفس. الاكسجين المذاب DO يظل عند مستوى ١٠٠%. خلال الساعات من ٤-٦ تبدأ الخلايا الخضرية فى التكاثر وتدخل مرحلة السكون Lag phase. مرحلة السكون حدثت من ٨-١٠ ساعات وعندما تصل الخلية الى كامل معدل نمو. لقد كانت زيادة CNA مرتبطة بعد الحيوية. القيمة القصوى لمحتوى الحمض النووى CNA والعد الحيوى كانت ١,١١٤ مللجم/مليلتر و $4,25 \times 10$ خلية (CFU)/مليلتر على التوالى. بعد ٩ ساعات من الزراعة حدث خفض كبير فى الاكسجين المذاب ووصل لاقل مستوى ٥% لمدة ساعتان ثم كان اكثر خفضا عن ٢٥,٢% وهى الحد الحرج للاكسجين المذاب. مع طول زيادة المجموع فان نقص الاكسجين المذاب DO يشبط الخلايا ولا تستمر فى النمو. لقد حدث نقص فى معدل النمو ثم توقف وبعدئذ لوحظت مرحلة ثبات. لقد ظلت معايير CNA, CFU ثابتة عند اقصى مستوى. داخل السيتوبلازم الخضرى تتكون جراثيم اولية وبلورات وتستهلك اكسجين اقل. الاكسجين المذاب DO

يسرّفع ويزداد ثانية ويظل حول النسبة ٧٠% حتى تصل الخلية لمرحلة الانهيار والتحلل. لقد اتضح ان التمثيل يسير بشكل قليل.

(٢) السكر الكلى TS والسكر الباقي RS ودرجة الحموضة PH:

لقد حدث استهلاك قليل جدا في السكر الكلى خلال نمو او انبات الجراثيم (الشكل ٦ -١٩). لم يحدث تغير واضح في محتوى السكر الكلى والباقي خلال الفترة من البداية وحتى اربعة ساعات. بعد ذلك ظهرت الخلايا الخضرية واطلقت كمية كبيرة من الانزيم الخلوى الخارجى. لقد حدث تحلل للكربوهيدرات الى الجلوكوز. محتوى السكر الباقي RS ازداد بسرعة ووصل لاقصى قيمة ٣,٤ ملليجرام/ملييلتر. يحدث بعد ذلك محتوى للجلوكوز الى حمض بيروفيك وحمض خليك خلال مسارات EMP, PP. لقد ادى تراكم الحمض العضوى الى خفض درجة الحموضة ووصلت الى اقل قيمة ٦,٣ بعد ٧ ساعات مع استمرار تحول احماض البيروفيك والخليك خلال دورة TCA لانتاج ATP ترتفع الحموضة وتصل الى القيمة ٧,٤ بعد ١٠ ساعات وهى درجة ملائمة للتجريم. ترتفع درجة الحموضة تدريجيا مع دوام تراكم الاحماض الامينية والامونيا. عند الحصاد كانت الحموضة اعلى من (٨). يستهلك السكر في مرحلتى نمو الخلايا والتجريم ولكن معدل الاستخدام اعلى في شكل نمو اسى. استهلاك السكر هو الذى يعطى الطاقة ونواتج التمثيل الوسيطة اللازمة لبقاء الخلايا وتكوين الجراثيم والبلورات. تمثيل السكر يلعب دورا في غاية الاهمية في تكاثر الخلايا. عند الحصاد وصل TS الى ١٧,١ مللجم/ملييلتر. لقد كان معدل الاستخدام ٣٩% هذا يعنى بقاء مكان لاستخدامات لاحقة للكربوهيدرات.



شكل (٦-١٨): نظم منحنيات DO, CFU, CAN

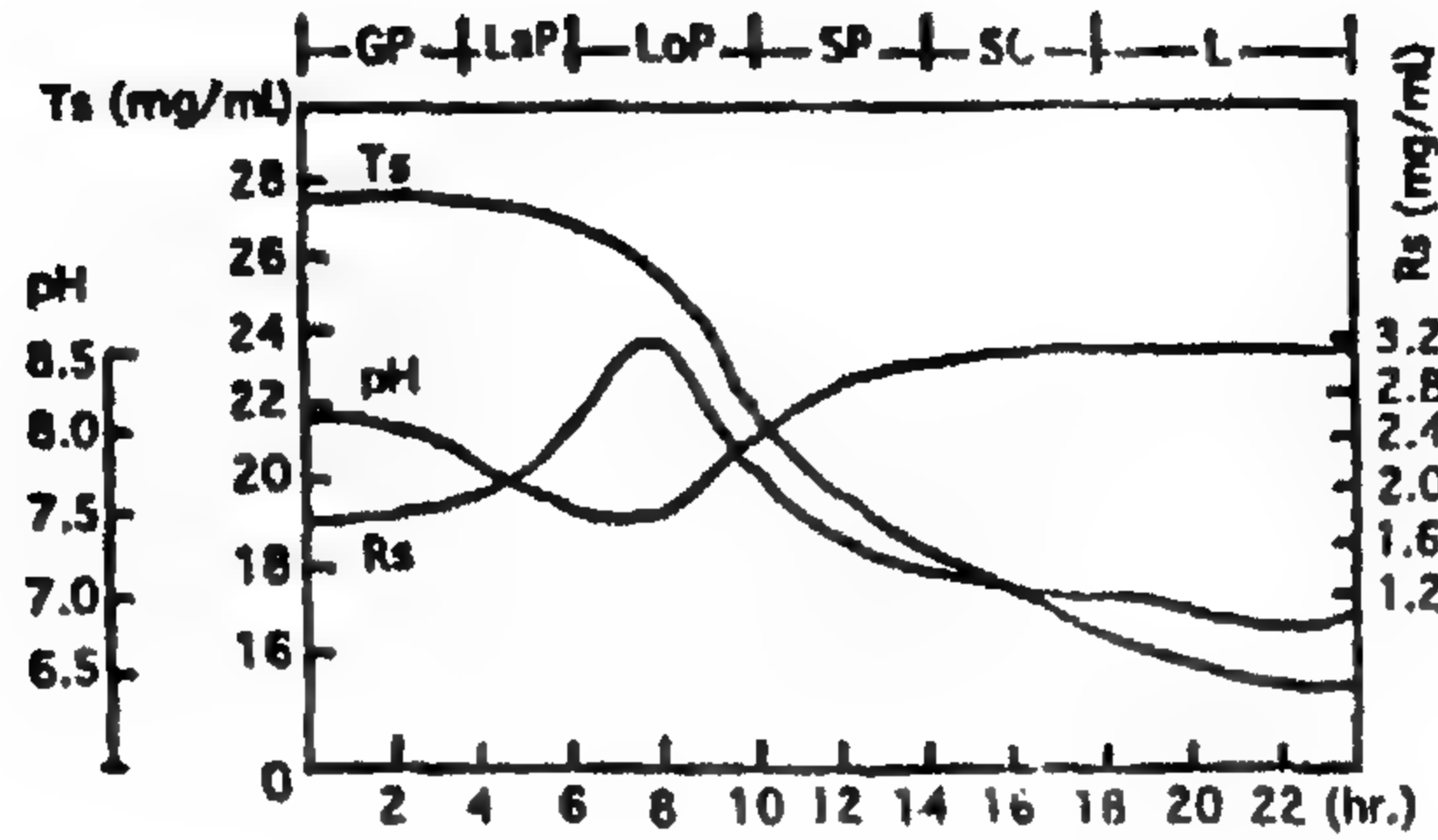


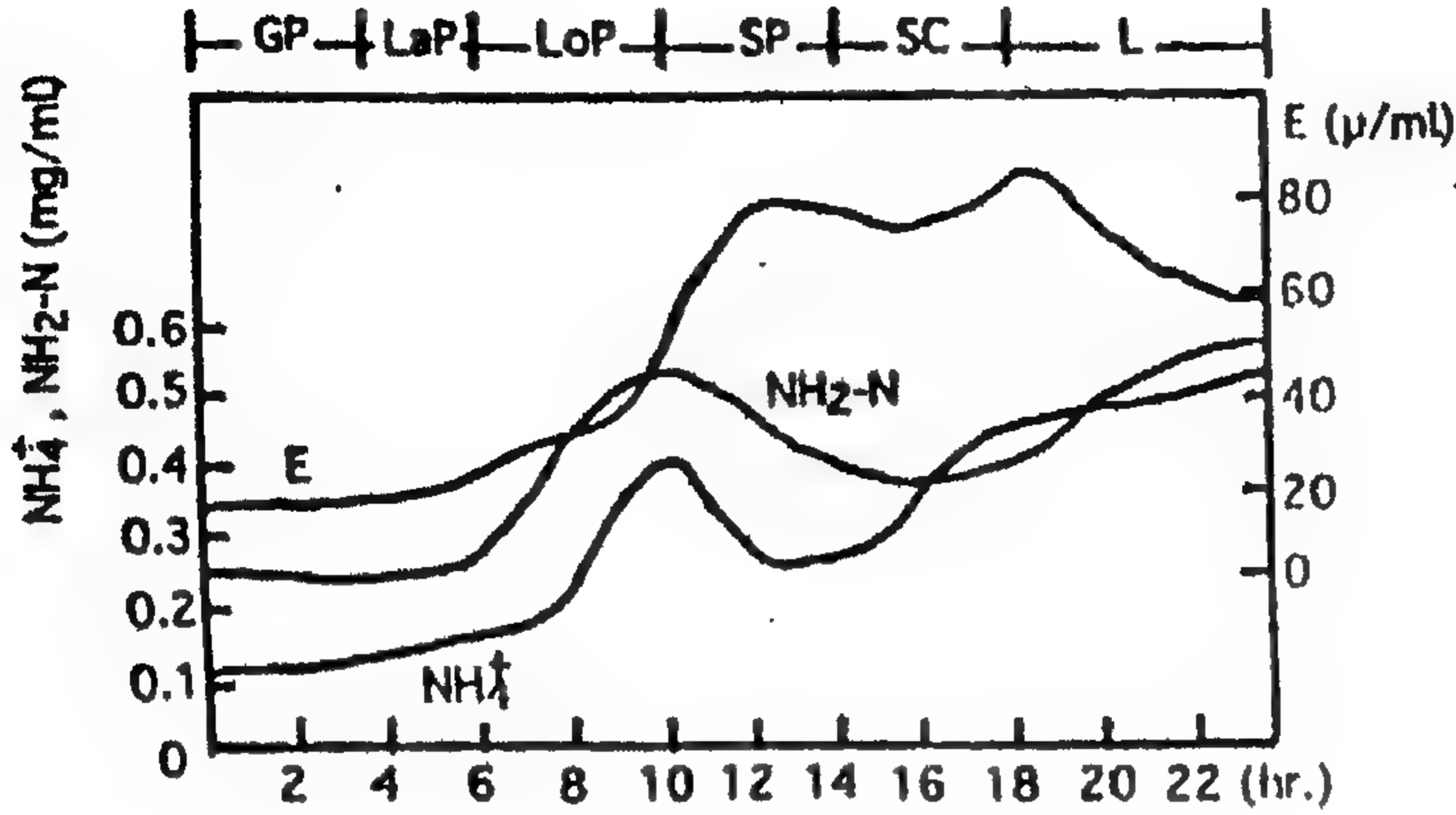
Figure 2. The patterns of Ts, Rs and pH curves.

| | | |
|------------------------|-----------------------|-----------------|
| GP = Germination Phase | LaP = Lag Phase | LoP = Log Phase |
| SP = Stationary Phase | SC = Sporulation Cell | L = Lysis |

شكل (٦-١٩) نظم محيات TS, RS الحموضة.

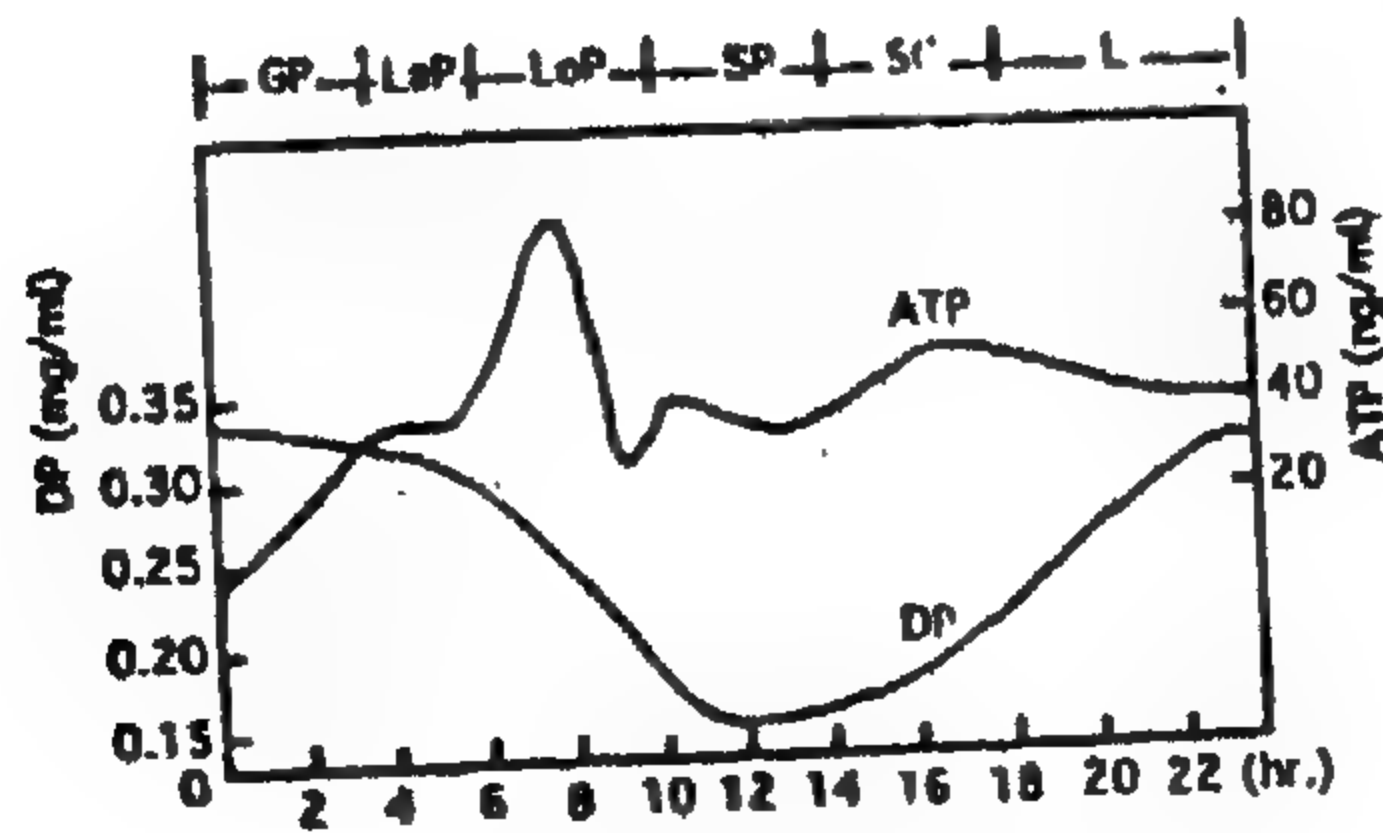
(٣) الحمض الامينى (ن يد ٢ - ن) والامونيا (NH_4^+) والبروتينيز الخلوى الخارجى (E) مع استمرار تكاثر الخلايا يزداد تراكم البروتينيز الخلوى الخارجى بالتدرج خلال المرحلة الساكنة Lag والمرحلة اللوغاريتمية Log (الشكل ٦-٢٠). مصادر البروتين تحلل جزئيا الى الاحماض الامينية كما يتحول جزء من الحمض الامينى L الى الحمض الالفى-كيتونى ويدخل دورة TCA المعكوسة. فى نفس الوقت تنفرد والامونيا. محتوى الحامض الامينى والامونيا تزداد وتصل لاقصى قيمة مع نهاية المرحلة اللوغاريتمية. خلال المرحلة الثانية يتوقف التكاثر وتتكون الجراثيم والبلورات. محتوى البروتينيز الخلوى الخارجى يصل للقيمة بعد ساعتان من بداية الوسط او المرحلة الثانية. يتم تحليل واعتبار مصادر البروتين بشكل كبير. لقد استخدمت كميات كبيرة من الاحماض الامينية والامونيا لتخليق الجزء البروتينى والبلورات. لقد ادى الاستخدام المستمر الى نقص تراكمها. لقد كان تمثيل النتروجين نشط جدا فى المرحلة الثابتة. قبل الحصاد يتوقف تكوين الجراثيم والبلورات ويحدث تحلل للخلايا. الاحماض الامينية والامونيا التى تنفرد وتحرر تؤدي الى زيادة فى تركيزاتها.

(٤) الفوسفور المذاب DP والادينوزين تراى فوسفات ATP



شكل (٦-٢٠): نظم منحنيات الحمض الاميني والامونيا والبروتينيز الخلوي الخارجى (E)

خلال نمو البكتريا Bt يتحول الجلوكوز خلال مسارات EMP, pp, ثم يدخل دورة TCA. الفوسفور من العناصر الضرورية. محتوى الفوسفور المذاب يتناقص بشكل تدريجى مع تكاثر الخلايا خارج المرحلة الثانية Lag وحتى المرحلة اللوغاريتمية وهما (الشكل ٦-٢١). بقايا الفوسفور المذاب بعدد ١٢ ساعة كانت ٠,١٥ مللجم/لتر فقط وهى اقل من نصف المحتوى الاصلى. ليس من الواضح ما اذا كان نقص الفوسفور يثبط تمثيل الكربوهيدرات ويسبب توقف التكاثر بينما تستمر وتتصاعد TS على المستوى العالى. لكن اضافة فوسفات البوتاسيوم ثنائى الايدروجين فى الوسط لم يظهر تأثير واضح على تحفيز وزيادة مستواه، التخمر.



The patterns of DP and ATP curves.

شكل (٦-٢١): نظم منحنيات ATP, DP

حصادى عشر: دراسة عن موائمة الاكسجين المذاب لرفع انتاجية جراثيم باسيلليس ثورينجنسيز بيرل.

من مقالة Xie Tianjian, Ma Tianliang, Xie Xinthu and Ding Qiumei باكاديمية هيوبي للعلوم الزراعية وكلية التكنولوجيا الكيميائية - يوهان-شرق الصين. لقد قدم السباحات للمقالة بالقول انه فى الثمانينات استخدمت بيئات عالية التركيز بشكل فعال لانتاج الباسيلليس ثورينجنسيز (B.t.) فى الصين وكان مستوى التخمير يقرب من ثلاثة امثال اكثر. لقد لعب هذا الاقتراب دورا هاما فى تحسين جودة المنتج وتقليل تكاليف الانتاج. فى الوسط على التركيز اظهر تحليل معايير التخمير ان الاكسجين المذاب (DO) ينخفض لمستوى قليل جدا خلال المرحلة اللوغارتمية. نقص الاكسجين المذاب احدث تثبيط فى اى تحسين لاحق لمستوى تخمر Bt. فى هذه الدراسات تاكد الاستهلاك الكبير للاكسجين والحاجة الى توضيح تاثير do على النحو الخلو. لقد تم تقدير تاثير عمليات ومتغيرات التشغيل الكبرى على معامل نقل الاكسجين المذاب وتاكد من امداد مناسب للاكسجين. اظهرت هذه الدراسة نتائج محددة واجبة الاخذ فى الاعتبار لتحقيق انتاجية عالية بجودة عالية وهى:

١- الحد الحرج للاكسجين المذاب (CDO) ومعدل امتصاص الاكسجين (OUR) فى مختلف مراحل نمو بكتريا الباسيلليس ثورينجنسيز (B.t.):

لقد وجد ان معيار CDO يقدم معلومات فى غاية الاهمية عن التزويد بالاكسجين فى عملية التخمير. عندما تنخفض قيمة الاكسجين المذاب DO عن هذا الحد الحرج CDO لا تستطيع الخلايا ان تنمو طبيعيا بشكل عادى وهنا يكون الامداد الزائد بالاكسجين غير ضرورى ويسبب كذلك ضياع للطاقة. الحد الحرج للاكسجين CDO فى المراحل المختلفة لنمو بكتريا Bt تم تقديرها بشكل حركى (اشكال ٦-٢٣ ، ٦-٢٤). فى هذا البحث قام الباحثين بالحساب تبعا للقيمة الحرجة لتركيز الاكسجين (شكل ٦-٢٤). خلال مراحل النمو المبكرة والمتأخرة تستهلك بكتريا Bt اكسجين اقل. القيم الحرجة لتركيز الاكسجين بعد ٤ ، ٢٢ ساعة من التخمير كانت ١٣,٢% ، ١٣,٠% على التوالى. خلال المرحلة اللوغارتمية خاصة فى نهايتها يصل الحد الحرج CDO الى القيمة ٢٥,٢% ويصل معدل امتصاص الاكسجين ٢٧,٨% مول/دقيقة. لقد اتضح ان المرحلة اللوغارتمية هى المفتاح المحدد لامداد الاكسجين.

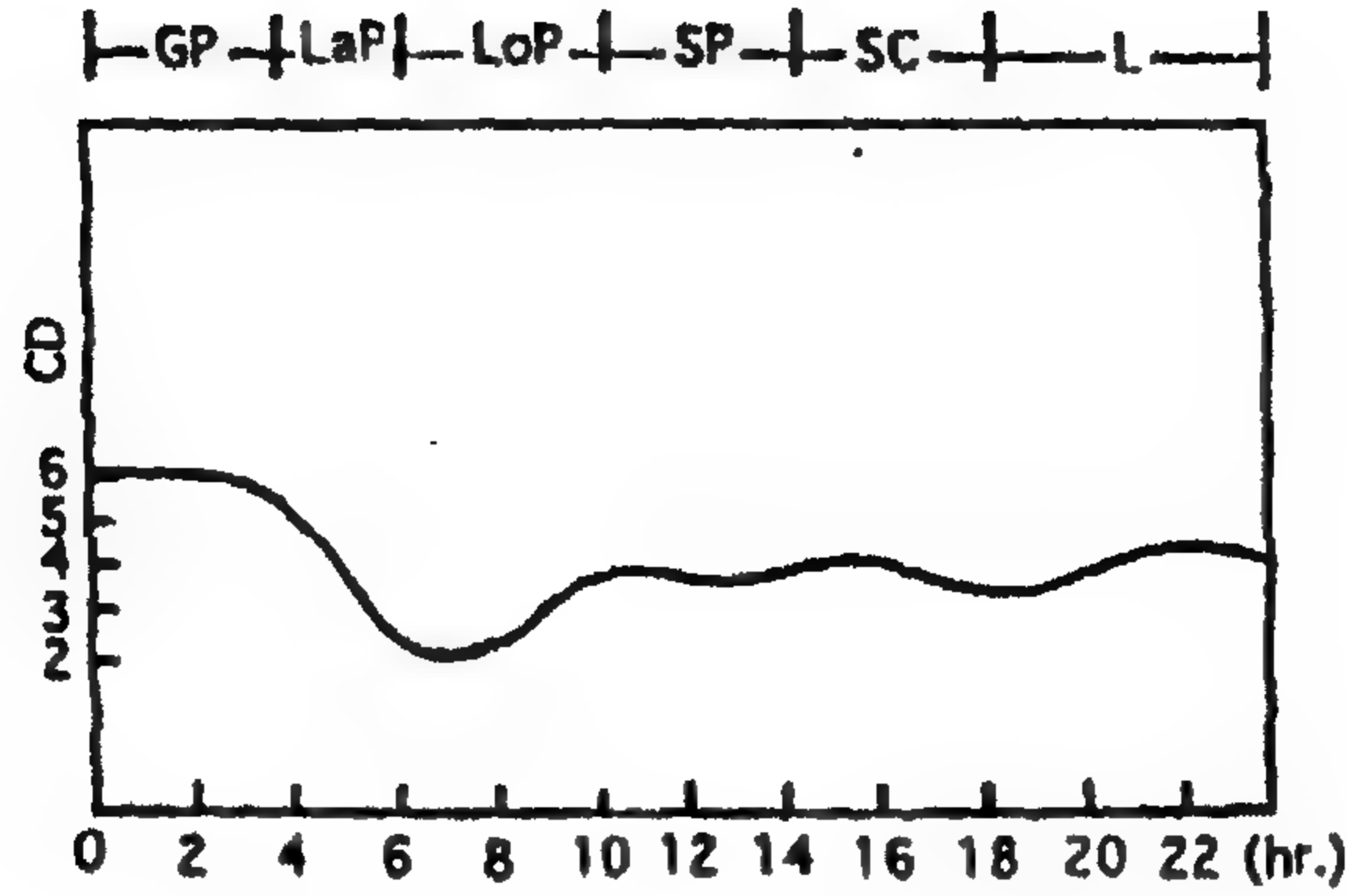


Figure 5. The patterns of viscosity curve.

| | | |
|------------------------|-----------------------|-----------------|
| GP = Germination Phase | LaP = Lag Phase | LoP = Log Phase |
| SP = Stationary Phase | SC = Sporulation Cell | L = Lysis |

شكل (٦-٢٢): الأكسجين المذاب الحرج

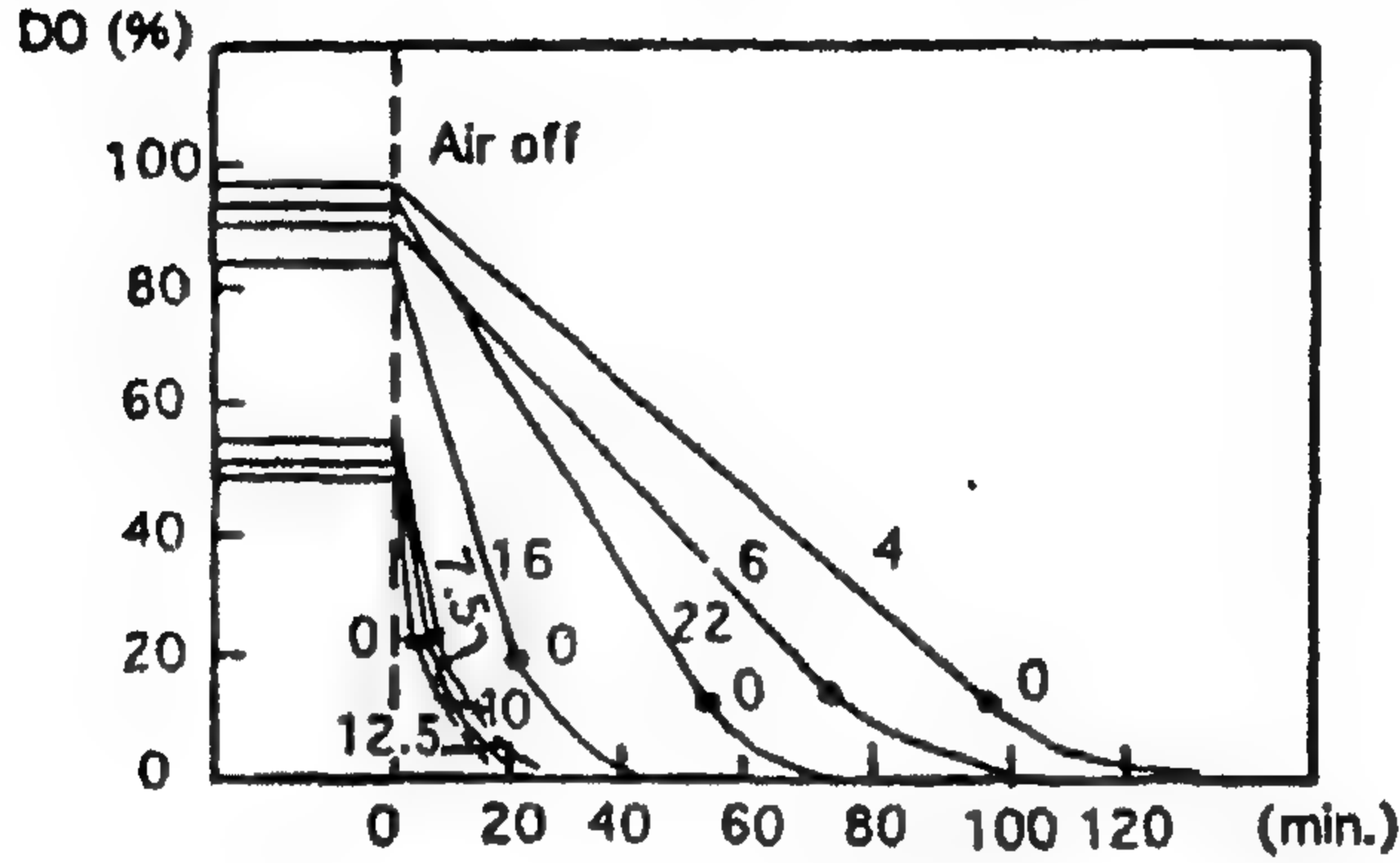
٢- نظم منحنيات الأكسجين المذاب DO في الأوساط مختلفة التركيز

يتم دمج استهلاك مصادر الكربون مع امتصاص الأكسجين نفس الوقت لخلق الأدينوزين. أظهر منحنى الطاقة ATP أن الهدم Catabolism يمثل نظام التمثيل الكبري قبل ٨ ساعات وكانت معدلات بناء الأدينوزين تراهي فوسفات ATP أكبر عن الاستهلاك. لقد زاد محتوى ATP بالتدريج ووصل للقيمة بعد ٨ ساعات. خلال المرحلة اللوغارتمية تتكاثر الخلايا الخضريّة بشكل اسي مع زيادة التخليق الحيوي. لقد كان معدل الاستهلاك سريعاً بشكل واضح عن معدل بناء الطاقة ATP. لقد نقص التراكم بشكل حاد. في نهاية المرحلة اللوغارتمية يتوقف النمو ويزداد محتوى ATP في الحال. خلال تكوين الجراثيم والبلورات يظل موجوداً بعض حالات استهلاك الطاقة لخفض منحنى ATP.

٣- اللزوجة Viscosity:

لقد تم قياس لزوجة البيئة والنتائج مدونة في الشكل (٦-٢٢). بعد أربعة ساعات تخرج الخلايا المنبئة انزيمات لتحويل النشا الى تحت وحدات. تناقصت اللزوجة بسرعة.

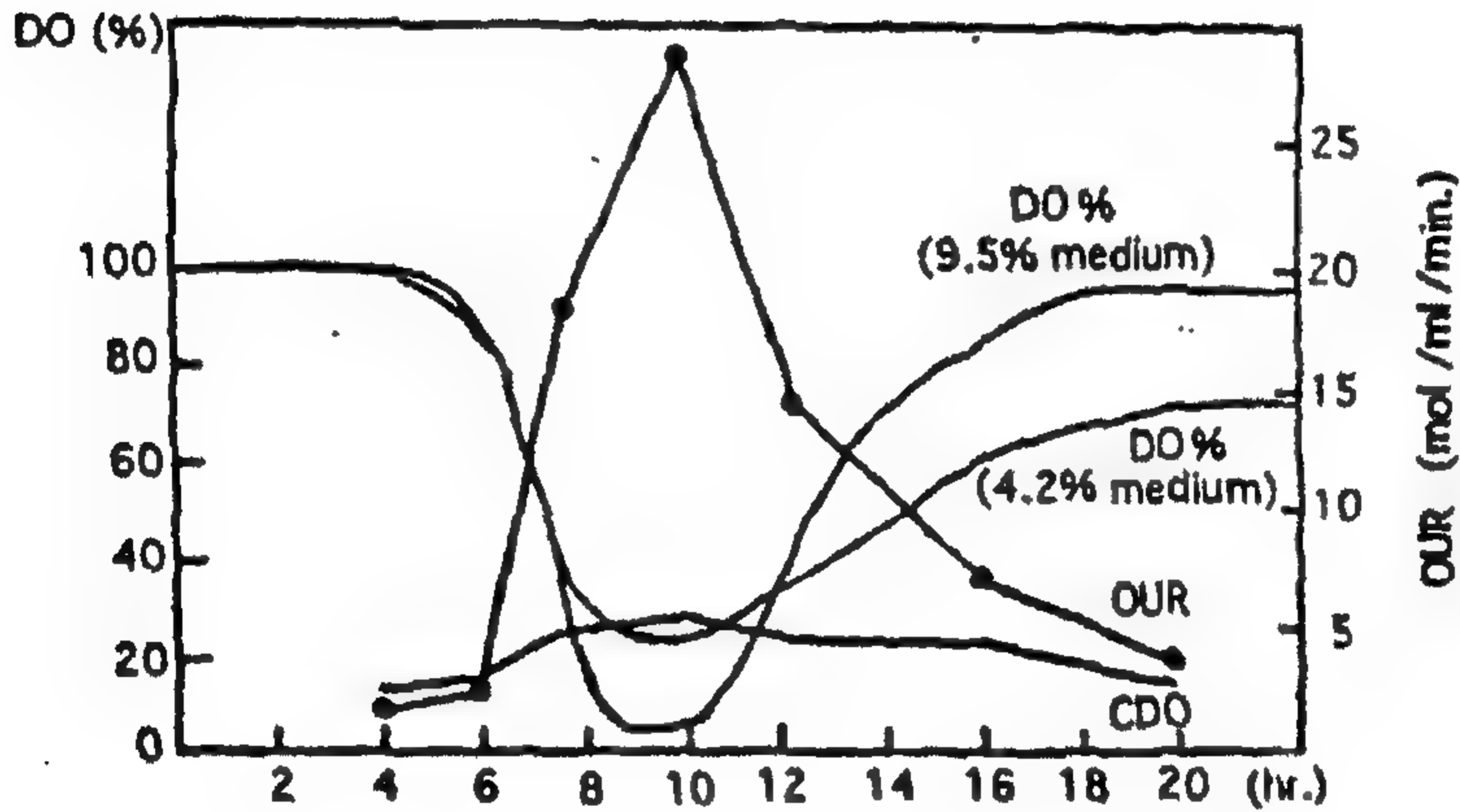
خلال المرحلة الثابتة lag تزداد اللزوجة مع زيادة مجموع الخلايا وتظل ثابتة نسبيا في المراحل الاخيرة. لقد ذكر ان الخلايا الخضراء تحتاج كمية كبيرة من الاكسجين في المرحلة اللوغاريتمية ولكن زيادة اللزوجة حفزت من مقارنة نقل الاكسجين ومن ثم خلقت صعوبة اكثر في الامداد بالاكسجين.



شكل (٦-٢٣): نظم منحنى اللزوجة

خلاصة القول انه من الممكن استخدام تقدير محتوى الحمض النووي لمعرفة مجموع الخلايا وهذا يحقق الاستفادة من السرعة والسهولة والدقة حيث يمكن الاستفادة من تقدير الحمض النووي للتحليل المتوسط لعملية التخمير. خلال المرحلة اللوغاريتمية تكون كل عمليات التمثيل في غاية النشاط. وهو يعتبر المرحلة المحددة لتحسين مستوى التخمير. ان ضبط تمثيل الكربوهيدرات اجري اساسا في هذه المرحلة. يجب تعضيد الامداد بالاكسجين. يجب اجراء مزيد من البحوث لمعرفة دور DP. التخليق الحيوي الكثيف لسبيلورات البروتين تعتبر الهدف النهائي لتخمير بكتريا B.t. العلاقات المتداخلة الواضحة بين التغذية بالنيتروجين والبروتين والبللورات قد تكون اساس السمية العالية للتخمير. لذلك يجب تعطين تمثيل النيتروجين خاصة من الوسط الثابت وحتى مرحلة التجريثم. تراه فوسفات ATP ونساج التمثيل الوسطى لتكوين وبناء الخلايا. البيئة عالية التركيز عادة تحتوي على جزء كبير من مصادر الكربون والتي تسبب زيادة في امتصاص معدل الاكسجين. نظم منحنيات الاكسجين المذاب (DO) للبيئة مع تركيزين ٤,٢ ، ٩,٥ % على التوالي موضحة في (الشكل ٦-٢٤). خلال مرحلة الانتاج لا يستهلك الاكسجين وتظل قيمة DO عند مستوى ١٠٠%. مع استمرار تكاثر خلايا B.t. يزداد معدل امتصاص

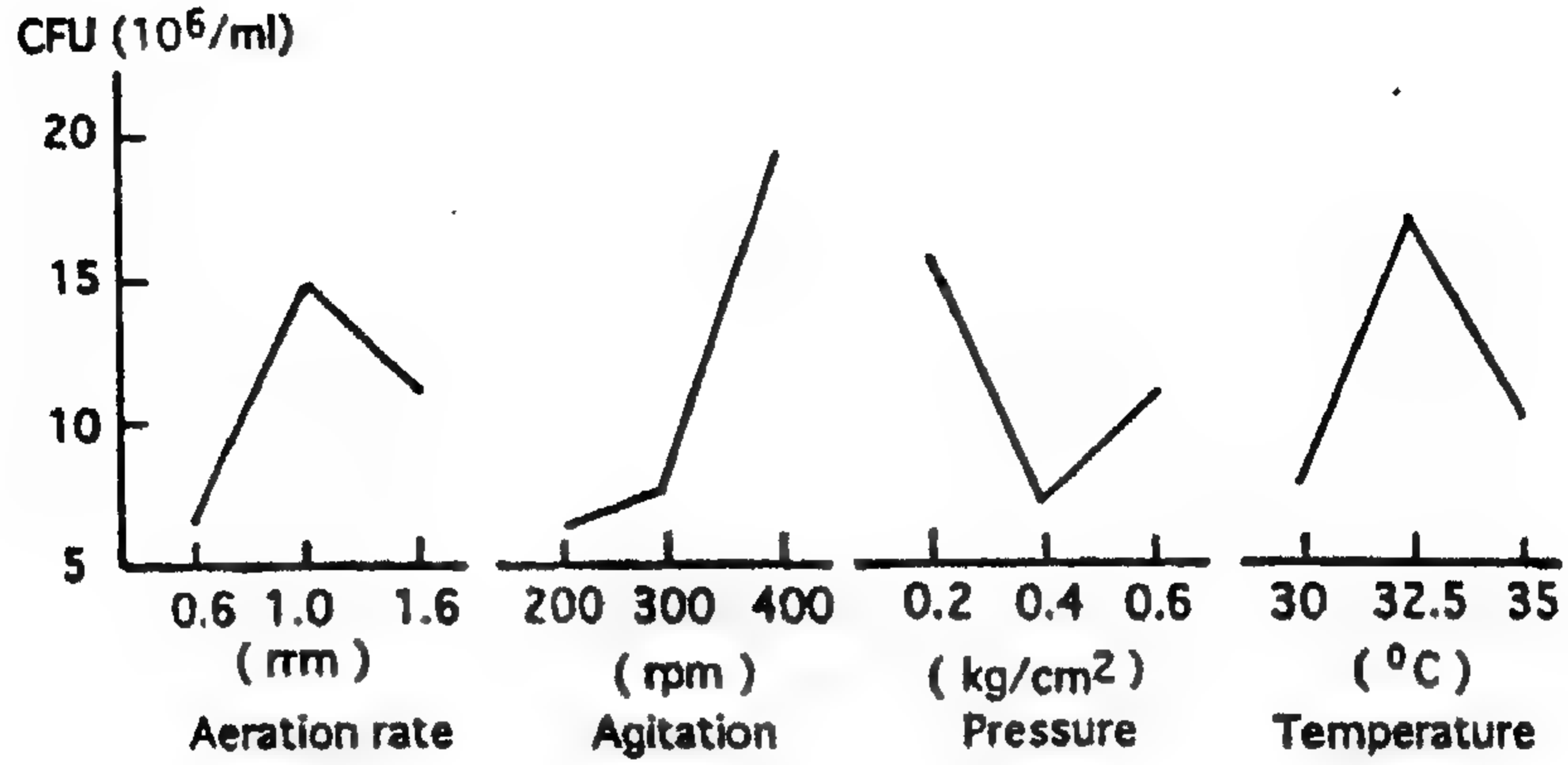
الأكسجين ثم تبدأ منحنيات DO في الانخفاض. خلال المرحلة اللوغاريتمية يحدث انخفاض حاد في منحنيات D وكانت أقل قيمة في البيئة ٤,٢ % هي ٢٣ % وهي قريبة من الحد الحرج للأكسجين المذاب CDO. أقل قيمة مع وسط تركيز ٩,٥ % كانت ٥ % والقل منها تحدث القيمة الحرجة لتركيز الأكسجين لمدة ٣,٦ ساعة. من الواضح ان نقص الأكسجين خلال المرحلة اللوغاريتمية كان كبيرا جدا مع استخدام بيئة ذات تركيز عالي. في مرحلة تكوين الجراثيم والبلورات يتناقص معدل امتصاص الأكسجين وترتفع منحنيات DO في الوسطين بسرعة.



شكل (٦-٢٤): نظم مستوي CDO ومنحنيات DO في لبيئة ذات التركيزات المختلفة

٤- تحسين امداد DO لزيادة مستوى التخمر:

لتحسين المزيد بالأكسجين باستخدام بيئة ذات تركيز عالي تمت دراسة دور اربعة عوامل مؤثرة هي سرعة الرج والتقليب ، معدل التهوية ، درجة الحرارة ، الضغط بواسطة اختبار التعامد Orthogonal. العدد الحيوي او معيار الحيوية استخدام بشكل غير مباشر لمعرفة مدى تحسين الأكسجين المذاب DO. العلاقة بين الحيوية وكل من العوامل الاربعة موضحة في الشكل (٦-٢٥). يتضح من الشكل ان الحيوية تتأثر بشكل كبير بعامل سرعة الرج ومن ثم يكون هذا العامل الأكثر أهمية مع DO.



شكل (٦-٢٥): العلاقة بين CFU وكل من العوامل المدروسة

نظم منحنيات الاكسجين المذاب DO مع سرعات التقلب والرج موضحة في الشكل (٦-٢٦). مع زيادة سرعة الرج والتقلب ارتفعت القيمة الاقل من منحنيات (DO). الفترة لما تحت معدل الاكسجين المذاب الحرج قصرت. مع سرعة تقلب ٣٠٠ لفة في الدقيقة rpm ٤٠٠ ، ٥٠٠ خلال عملية التخمير كانت اقل قيمة DO ٥% ، ١٨% ، ٢٥% على التوالي. عندما زادت سرعة التقلب عن ٥٠٠ لفة/دقيقة كان منحنى DO اعلى من القيمة الحرجة لتركيز الاكسجين مما يوضح ان امداد الاكسجين كان كافيا. رفع سرعة التقلب زاد من تركيز الاكسجين المذاب. عدد الخلايا الحية مع سرعات التقلب المختلفة تم تقديرها والنسائج مدونة في الشكل (٦-٢٧) مع ارتفاع سرعة التقلب زادت عدد الخلايا الحية كما زاد معدل استخدام السكر الكلى كذلك. لقد اتضح ان رفع سرعة التقلب زادت من تركيز DO مما ادى الى تحفيز عدد الخلايا الحية. لكن تأثير المناطق المختلفة وسرعة التقلب على مستوى التخمير تباينت بشكل معنوي. عندما ارتفعت سرعة التقلب من ٣٠٠ الى ٤٠٠ لفة في الدقيقة زادت حيوية واعداد الخلايا بمقدار ٧,٤٧% بينما وصلت الى ٣١,٤ ، ٤,٢% عندما زادت الخلايا الحية من ٤٠٠ الى ٥٠٠ لفة / دقيقة ومن ٥٠٠ الى ٦٠٠ لفة في الدقيقة على التوالي. لقد تاكد ان سرعة الرج من ٤٠٠ الى ٥٠٠ لفة في الدقيقة تعتبر المنطقة الافضل. الامداد الزائد للاكسجين اظهر تأثير قليل على تحفيز عدد الخلايا الحية.

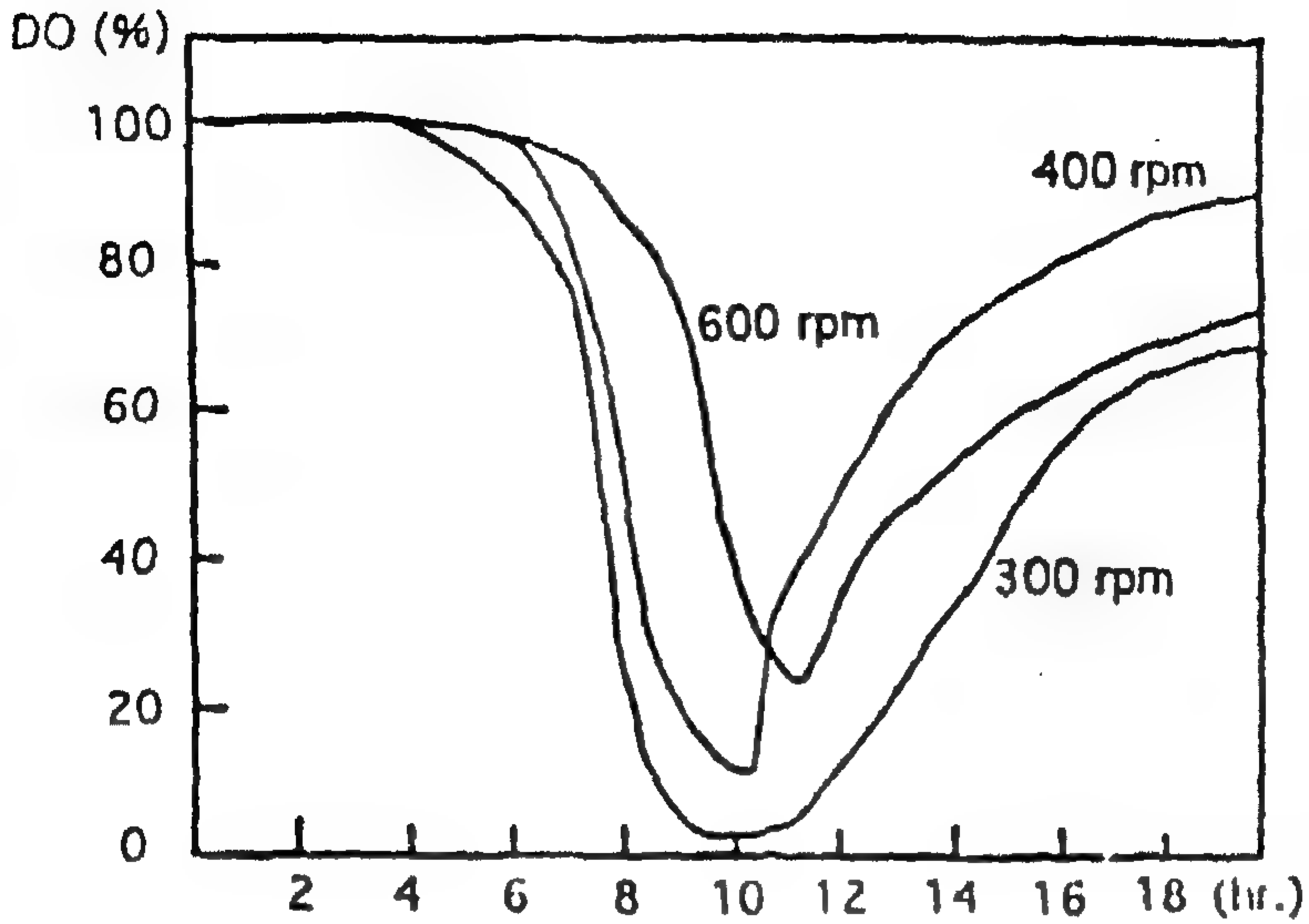
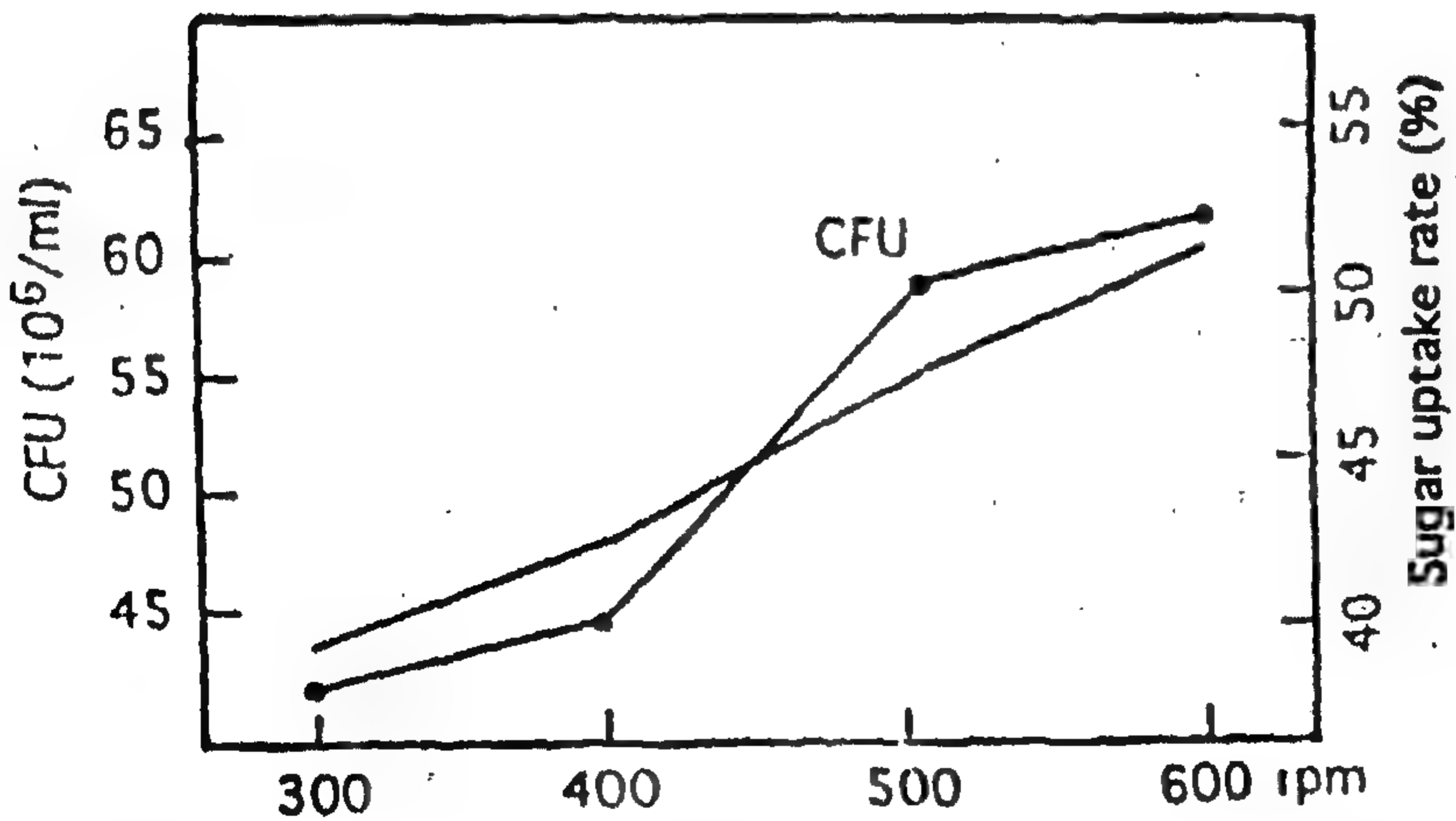


Figure 4. The patterns of DO curves of different agitation speed.



شكل (٦-٢٧): العلاقة بين CFU ومعدل استهلاك السكر مع سرعان تقليب مختلفة.

ثاني عشر: انتاج واستخدام الباسيلليس ثورينجنسيس في وقاية المزروعات في البرازيل
 من مقالة للباحث I.D-Moraes بقسم هندسة وتكنولوجيا الغذاء / UNESP -
 البرازيل. لقد قدمت بكتريا الباسيلليس ثورينجنسيس في البرازيل لأول مرة عام ١٩٦٠ في
 المعهد الزراعي بكابينااس (IAC) وهو المعمل المركزي ولكن الوضع التقني والفني لم
 يكن كافيا لتحفيز وتعقيد استخدامها حيث لم يستطع الفلاحين فهم الاختلاف الكبير بين
 المبيدات الحشرية الكيميائية والحيوية ونواحي الاختلاف في الفعل والفاعلية. لقد حدث
 نقوش في فهم الموضوع لان المبيدات الكيميائية التقليدية تقتل الحشرات بسرعة وفي
 الحال على عكس المبيدات الحيوية. في ذلك الوقت لم تكن المشاكل الناجمة عن الافراط
 والخطأ في استخدام المبيدات الكيميائية قد نوقشت بعد مقارنة بما يحدث الان حيث تبذل
 جهود كبيرة في البرازيل لتقليل والسيطرة على مستوى التلوث وكذلك تشجيع اللجوء الى
 المبيدات الكيميائية داخل اطار وبرامج مكافحة المتكاملة. مع زيادة اهتمام العامة عن
 الامان البيئي قام العديد من البحوث والجماعات باقتراح دراسات تحقق بيئة افضل في العام
 التالي انعقد المؤتمر العالمي للبيئة في البرازيل عام ١٩٩٢ وفيه تم القرار باهمية ادارة
 الملوثات والتي يمثل استخدام وانتاج المبيدات الحيوية النصيب الاساسي. منذ ١٩٩٠ كان
 بيع المبيدات الحشرية يحتاج الى رخصة زراعية تصدر من مهندس الزراعة او مهندس
 الغابات وكان ذلك صريحا في التشريعات من خلال القانون ٩٠/٧٨٠٢ وهو القانون
 البرازيلي الخاص بالتعامل مع السموم الزراعية. لقد قامت العديد من الشركات العالمية
 الكبرى سواء منفردة او بالمشاركة مع الصناعات البرازيلية دراسات خاصة بامكانيات
 الانتاج الموسع للمبيدات الحيوية الحشرية. بين المشاكل التي واجهت هذا التوجه هو حجم
 السوق وهو ليس بالكبير بحيث يشجع على انشاء مصنع يعمل فقط على انتاج بكتريا
 الباسيلليس B.t. المنتجات التي بيعت في البرازيل كانت مستوردة وتسوق بواسطة شركة
 مرك شارب دوم (ديبيل من معامل ابوت في امريكا) وساندوز (ثوروسيد). في السبعينات
 قامت شركة Rhodia بتسويق مستحضر الباسيلليس باكتوسبين من رون بولانك. هذه
 مبيدات حشرية ضد حشرات حرشفية الاجنحة ولكن في السنوات الاخيرة وبعد اكتشاف
 السلالة اسرائيلينسيس الفعالة ضد يرقات البعوض انت الى قيام بعض المعاهد البحثية
 البرازيلية بعمل محاولات لتطوير هذا المنتج ضد بعوض الايبس والكيوليكس. لقد
 استهدفت شركات سيبا-جايجي وشل انذاك انتاج البكتريا في البرازيل.
 بحوث بكتريا B.t. في البرازيل:

عام ١٩٧٠ بدأت مجموعة من الباحثين فى قسم الهندسة الغذائية بجامعة كامبيناس بدراسة هذا النوع من المبيدات الحشرية البكتيرية التى تنتج فى عمليات التخمير المغمور. من ١٩٧٠ وحتى ١٩٧٦ ثم حصول على درجتان علميتان احدهما للماجستير والاخرى للدكتوراه وثم الحصول على براءة اكتشاف وحقوق ملكية لعملية انتاج الباسيلليس فى البرازيل لقد كانت هذه الدراسات تركز على انتاج الاندوتوكسين عن طريق تخمر التحضيرية وكانت البيئة تتكون من مولاى قصب السكر (١٠ جم/لتر) والذرة (٢٥ جم/لتر) مع استخدام وحدة تجهيز صغيرة من ١-٢٠ لتر. اجريت بعض التجارب فى مخمر سعة ٢٥٠ لتر باستخدام البيئة حيث درست انسب ظروف التهوية والتقليب للوقوف على محددات عملية التخمير. لقد كانت تكاليف مصادر الكربون والنيتروجين والاحماض الامينية والفيتامينات قليلة كما كانت متوفرة فى البرازيل فى الفترة من ١٩٧٦ وحتى ١٩٨١ تحولت الدراسات فى اتجاه التوكسين الخارجى extended وحصل الباحث على جائزة محلية عام ١٩٨٥. خلال نفس الفترة تم انهاء دراسات عن تأثير معدلات التهوية والتقليب على البكتريا وانتاج المركب وكذلك عن عملية التخمير المستمرة (١٩٨٢). لتقليل التكاليف قام الباحث بدراسة انواع مختلفة من المواد الخام خاصة بقايا المواد الغذائية المائية والمشروبات الاخرى ومخلفات الصناعة. منذ ١٩٨٩ دخلت جامعات ومعاهد اخرى فى البرازيل فى الدراسات مثل جامعة UNESP بتعزيد من هيئات محلية وعالمية كثيرة.

استخدامات بكتريا Bt:

لقد تم نشر العديد من المقالات عن استخدامات بكتريا Bt والسلالة الاسرائلية. لقد استخدمت المنتجات المستوردة بسبب عدم وجود انتاج محلى. الباحث يستطيعون انتاج هذه السلالات فى المعمل على مستوى صغير فى القلابات ووحدات التخمير الصغيرة لقد صادف الباحث مشاكل عديدة عند محاولة الانتاج على مستوى كبير تجارى خاصة ما يتعلق باختبارات الجودة والقياسية وتجهيز المستحضرات والتسجيل/التداول وكذلك النسبة بين التكاليف / الفوائد.

References

Benetoli, I. ; Donaires, F.S. ; Yamamoto, P.T. and Gravena, S. (1991). Biological control of soybean caterpillar *Anticarsia gemmatilis*, with *Bacillus thuringiensis* and influence against natural enemies. XIII Cong. Bras. Ento. Recife, Brazil. Abstracts.

Capalbo, D.M. (1982). A contribution to the study of continuous fermentation of *Bacillus thuringiensis* M.Sc. thesis, 81 pp. UNICAMP. Brazil (Advisor MORAES, I.O.).

Capalbo, D.M. and Moraes, I.O. (1984). Study of continuous fermentation for obtaining bacterial insecticide to control agricultural pests. IV Japan Brazil Symposium on Science and Technology. V. 2, 248-255.

Gravena, S. ; Sanguino, J.R. (1980). Biological control of the sugar cane borer *Diatraea saccharalis* using egg predators and *Bacillus thuringiensis*, Proc. Entom. Soc. Brazil. 9 (1), 87-95.

Gravena, S. et al, (1983). Cotton integrated pest management strategies in Jaboticabal-SP, with *Bacillus thuringiensis* and beneficial arthropods. Proc. Ent. Soc. Brazil, 12 (1), 17-29.

Moraes, I.O. ; Capalbo, D.M. and Moraes, R.O. (1990). Bacterial insecticide production by *Bacillus thuringiensis* in : food biotechnology. 4 (1), 282.

Moscardi, F. ; Gomes, D.R. and Morales, L. (1991). Field evaluation of *Bacillus thuringiensis* isolates for control of the velvet bean caterpillar (VBC) in soybean and their relative virulence to VBC and to the soybean looper under laboratory conditions. XII Intern. Plant Protection Congress. Rio de Janeiro. Brazil. Abstracts.

Villani, H.C. ; Campos, A.R. and Gravena, S. (1980). Efficiency of *Bacillus thuringiensis* and phenitrothion plus phenvalerate to control *Dione juno* in passion flower. Proc. Entom. Soc. Brazil., 9 (2), 255-260.

ثالث عشر: الباسيلليس ثورينجنسيز والامان البيئي:

من مقالة للدكتور مطر بالمركز القومي للبحوث - مصر حيث قدم للمقالة بالقول ان التلوث المزائد للبيئة والمخلفات السامة ومشاكل تطور المقاومة في الافات وسرطانية المبيدات الحشرية الكيميائية ادت الى تحفيز العديد من البحوث نحو ايجاد بدائل جديدة اكثر امانا وحدث نفس الشئ مع الصناعة. الممرضات الحشرية وما تتمتع به من تخصيصية نسبية جذبت انتباه العديد من الباحثين منذ حقبة عديدة من الزمان. لقد اعتبرت بكتريا باسيلليس ثورينجنسيز من الممرضات الفعالة ضد العديد من الافات الحشرية التابعة لرتبة حرشفية الاجنحة. لقد كان هناك خوف من احتمالات حدوث انتخاب لهذه الممرضات الحشرية بطريقة او باخري بحيث قد تتحول الى ممرضات للفقاريات. في عام (١٩٥٨) اعلن الباحث براون ومعاونوه ان سلالات بكتريا B.t. لا يمكن ان تتحول لتصبح ممرضة للفقاريات. قبل تصنيع وادخال هذه الوسيلة الحيوية في مختلف برامج مكافحة يجب اجراء دراسات مكثفة عن الامان الحيوى والبيئى وفى هذا المقام سوف نشير الى ماحدث فى بعض الدول. لقد صممت دراسات الامان لتحويل درجة امان Bt على اللافقاريات النافعة والفقاريات (الطيور - الحيوانات - الانسان) والنباتات كذلك نشرت دلائل لتقييم امان الوسائل البكتيرية بواسطة هيئة الصحة العالمية WHO.

تقييم السمية على الانسان:

من المعروف ان سلالات بكتريا Bt تنتج سموم عديدة. لقد تم تقييم الفعل السام لكل سلالة باستخدام بروتوكولات الاختبارات التقليدية المتعارف عليها على الجرذان والفئران والارانب وخنازير غينيا وغيرها. لقد اعطيت الحيوانات جرعات عالية كانت تتراوح من متوسط الجرعة الحقلية ومضاعفاتها حتى ١٠٠ مرة اعلى. لقد كانت طرق المعاملة عن طريق الفم والحقن البريتوني وتحت الجلد وعن طريق الاستنشاق والتعرض القمى او المعاملة الجلدية. فى حالة تقييم السمية الحادة كانت تعطى الجرعة مرة واحدة متبوعة بفترات ملاحظة تختلف فى الطول بناء على نوع الاختبار. المعاملة على المدى الطويل (٢ اسبوع وحتى ٦ شهور) للجرعات تحت القاتلة استخدمت لتقييم السمية المزمنة. حديثا اجريت دراسات عن التأثيرات الفسيولوجية والهستوباثولوجية فى داخل وخارج جسم الحيوانات مع فحص قطاعات دقيقة من الاعضاء المختلفة للوقوف على تأثير التوكسينات على العمليات الفسيولوجية المختلفة والوظائف الخلوية للحيوانات.

التأثير على الفقاريات:

لم يشير الباحث فيشر وروزنر (١٩٥٩) ، براون ومعاونوه (١٩٥٨) وغيرهم الى اى دليل عن الطبيعة المعدية لمستحضرات بكتريا Bt على الثدييات والطيور سواء اعطيت عن طريق الفم او من خلال الحقن اليريتونى. جراثيم البكتريا ظلت حيه فى براز حيوانات التجارب. الجرعات العالية تحفز المرضية البكتيرية Bacterimia والتي اختفت بعد ٢-٤ ايام من المعاملة. لقد لاحظ Godavaribi وآخرون (١٩٦٢) عدم حدوث ايه تغيرات مرضية او عدوى موضعية فى الكبد والكلى وانسجة الطحال فى الفئران التى سبق معاملتها عن طريق الفم منذ ثلاثة شهور بجرعات عالية من جراثيم Bt. لقد اشار لامانا وجونز (١٩٦٣) ان جراثيم مزرعة نمو Bt كان ١٠٠ مرة اكثر سمية عن مزرعة التجريم. لقد سجلت ملاحظات مختلفة على الطيور والتي عوملت لفترات طويلة (٢٨-٧٠ يوم) بجرعات يومية من Bt تتراوح من ٠,٢-١٠,٥٧٠ جراثيم/طائر (فيشر وروزنر ١٩٥٩). لقد اشار الباحث Ignoffo (١٩٧٣) بعدم حدوث ايه تأثيرات معاكسة عندما استخدمت تجهيزات خالية من التوكسين الخارجى بينما حدث فقد الوزن وخفض فى الغذاء المستهلك عندما عوملت الطيور بالبيتا-اكسوتوكسينات لبكتريا Bt. كذلك اجريت تجارب على متطوعين ادميين فقد اثار الباحث Rosner (١٩٥٩) ان كل متطوع استشق ١٠٠ ملجرام من المسحوق يوميا على امتداد خمسة ايام. بعد ٤-٥ اسابيع تم اعادة فحص المتطوعين ووجدوا اصحاء وكانت كل الاختبارات المكثفة فى المعمل اسفرت عن نتائج سالبة. لقد تم اختبار السمية الحادة والسمية للثوروسيد (B.t.) على صورة معلقات (٣٣%). لقد وضعت جرعات حتى ٢٤ جم من الثوروسيد مباشرة فى معدة الفئران. لم تحدث ايه وفيات او اعراض سمية حتى اسبوع من المعاملة.

فى العقد الاخير اجريت دراسة مرضية شاملة وقد اظهرت النتائج نفس الاستنتاجات السابقة. فى اليابان وجد Nishiitsutsuji ان الاندوتوكسين البلورى لبكتريا Bt ليس له تأثيرات سامة على الخلايا Cytotoxic حتى على المستوى التراكيب الدقيقة وكذلك لم تحدث ايه تغيرات مورثولوجية او تثبيط نمو على خلايا الثدييات. هذا على عكس التأثيرات التقليدية على خلايا الحشرات (انتفاخ وانفجار للخلايا الطلائية العمادية التى تبطن المعدة الوسطى). لقد لاحظ ثوماس وايلد (١٩٨٣) ان البلورات القابلة للذوبان فى القلوية للبكتريا B.t من الصنف كورستاكى لم تظهر ايه تأثيرات سامة فى داخل وخارج الجسم من الفواحي المرضية التشريحية او اى نشاط لتحليل خلايا الدم فى الفئران

والجرذان والاحصنة والغنم والانسان فيما يتعلق بكرات الدم. من جهة اخرى فان التوكسينات الخارجية الموجودة في رائق مزارع النمو لنفس سلالات بكتريا Bt سببت بعض التغيرات المرضية في خلايا الثدييات عندما عوملت في الحيوانات بجرعات عالية ولمدة طويلة. لقد وجد Meretoja وآخرون (١٩٧٧) ان التركيزات السامة للتوكسينات الخارجية تحفز زيادة معنوية وكبيرة في حدوث التغيرات الكروموسومية بينما التركيزات الواطية لم تؤثر على انقسام الدم للحيوانات المعاملة. التجارب التي اجريت بواسطة نفس المؤلفين في داخل جسم الحيوانات اظهرت تأثير Clastogenic فقط عندما تم احلال ماء الشرب للحيوان بمقدار ٥٠ ، ١٠٠% من المركب المختبر على امتداد ثلاثة شهور عندما اعطيت الفئران جرعات قاتلة من الطرز السيروولوجي I (الرائق). وجد كذلك ان المعاملة برائق الطرز الوراثي (٣) احدثت تأثير اورام قليلة. في عام ١٩٧٩ وجد Kahkonen وآخرون ان بعض التأثيرات المرضية (التأثيرات الميتوزية - ٢) لوحظت في الخلايا في حيوانات الاختبار عندما عوملت بجرعات عالية من البيتا اكسوتوكسين للبكتريا Bt بينما التعرض لجرعات حقلية لم تجرى تقييم للتأثيرات الطفرية او الاورام. لقد استنتج ان اخطار السلف الخلوي الوراثي Cytogenetic damage للانسان التي تسببت بواسطة الاكسوتوكسين في الكميات التي استخدمت في مكافحة الافات الحشرية ليست ذات معنى اى يمكن تجاهلها. كذلك فان مزرعة بعض سلالات B.t. اثرت على ارتباط الكالين فوسفو داي استريز I مع غشاء بلازما للامعاء والبنكرياس. لقد اشار تاجوشى وآخرون (١٩٨٥) ان الالكالين فوسفانتيز في وجود التوكسين قد تحرر بكميات معنوية كبيرة عما هو الحال مع المقارنة ولكن دون تحلل الخلايا. لقد اظهرت معظم دراسات الامان الحيوي التي ذكرت سابقا ان التوكسينات الخارجية كانت امنة بما فيه الكفاية اذا استخدمت بالتركيزات الحقلية الموصى بها وكذلك فان معظم المصانع تجابه الان تقييد في جودة انتاج المستحضرات التجارية بحيث تكون خالية من التوكسينات الخارجية لبكتريا Bt. الرائق المحتوى على توكسينات غير مرغوبة استبعد ويتم التخلص منه نهائيا. بعض اصناف البكتريا B.t. ليست منتجة للتوكسينات الخارجية مثل الصنف كورستاكي ومن ثم تكون في منتهى الجذب لرجال الصناعة. لقد حدث تقدم حديث في مكافحة ببكتريا Bt وكذلك تقدم مذهل في تكنولوجيا نقل الجينات بما يضمن بادخال المركب السام الفعال للدلتا- اندوتوكسين للبكتريا Bt الى البيئة.

التأثير على الحشرات النافعة: فيما يتعلق بالتأثير على نحل العسل اشار الباحثان Krieg and Henfs (١٩٦٣) ان تجهيزات الجراثيم والبللورات كانت عديمة الضرر على نحل العسل مع الجرعات الموصى بها بينما رائق بكتريا Bt ثورينجنسيز كانت عالية السمية لشغالات النحل. لقد ذكر Krieg (١٩٦٤) ان التركيزات الموصى بها من B.t. فى العمليات الزراعية ليست ضارة على شغالات النحل. بالنسبة للتوكسين الخارجى ذكر كيريج (١٩٦٧) ان معدل الجرعات العادية فى التطبيقات الحقلية كانت سامة على نحل العسل.

بالنسبة للتأثير على الاعداد الطبيعية تاكدت ادلة عن الامان على العديد من الاكاروسات المفترسة والحشرات الملتهمية (سلامة واخرون ١٩٨٢ و ١٩٨٥، البنهاوى ومطر ١٩٨٦). فى بعض الحالات تأثرت بعض النواحي الحيوية (طول الدوام ، خفض مقدرة التغذية، نقص بسيط فى الخصوبة) بدرجة بسيطة من جراء المعاملة ببكتريا Bt. لقد اشار Dirimanerv واخرون (١٩٨٠) انه عند استخدام Bt مع الترايكو ما حدث نقص كبير فى الضرر الذى تحدثه الفراشة الفجرية وصل الى ٤% فقط عند الحصاد. المبيدات الكيميائية تقلل من التلف حتى ١% ولكن خفض المعاملات بالمبيدات احدث زيادة كبيرة فى كثافة المفترسات سيرفدى ، كريزوبيدى ، الاكاروس المفترس وابى العيد وغيرها. لقد فكر مارشالى (١٩٧٥ أ.ب) ان الطفيل قد يكون له تأثير معاكس على الممرض والعكس صحيح (خفض كمية الغذاء التى تؤخذ بواسطة العائل قد تخفض من الجرعة الفعالة بينما موت اليرقات بسبب الممرض قد تقتل الطفيل). لقد حدثت تأثيرات تنشيطية عندما استخدمت Bt بجرعات منخفضة تسمح بوقت كافى للطفيل كى ينتج قبل موت العائل. لقد تم تقييم التأثيرات التنشيطية بين الطفيل وبكتريا Bt فى التجارب الحقلية بواسطة Sneh (١٩٨٣). لقد وجد سلامة وزكى (١٩٨٥) عدم حدوث تأثيرات ضارة فى تطور الاطوار غير الناضجة للطفيل T.evanescens او النسبة المتوقعة للخروج عندما استخدم الممرض على بيض العائل قبل وبعد التطفل. اخيرا وليس اخرا دعونا نتطلع للمساهمة فى خلق بيئة افضل خالية من اضرار المبيدات الحشرية وما يستتبعها من تلوث. لقد جاء الوقت لبكتريا Bt وغيرها من الوسائل الحيوية الامنة كى تاخذ نصيبها فى مكافحة الافات فى ظل تسجيلات حقيقية وتوصيات فعالة.

REFERENCES

- Brown, e.r.;Mady, M.D.; Treece, E.L. and Smith, C.W. (1958). Differential diagnosis of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis* and *Bacillus cereus* var *mycoides*. J. Bacteriol, 75, 499-509.
- Dirimanov, M.;Angelova, R. and Sabrikova, T. (1980). State of the harmful entomo and acarofauna and predacious species of insects in apple orchards with some plant protection technologies. Nauchni trudova, ent. Microbiol. Fitopathol. 25 : 15-30.
- El-Banhawy, E.M. and Matter, M.M. (1986). Reaction of the predaceous mite *Amblyseus gossipi* to three varieties of *Bacillus thuringiensis* under laboratory conditions. Bull. fac. Of agric. Univ. of cairo 37, 1067-1077.
- Fisher, R.A. and Rosner, L. (1959). Toxicology of the microbial insecticide thuricide. J. Agric. Ed., chem., 7, 636-688.
- Grodavaribi (1962). Bacterial spores with malathion for controlling *ephestia cautella*. Pest technol. London 4, 155-158.
- Ignoffo, C.M. (1973). Effects of entomopathogens on vertebrates. Ann. N.Y. Academy of science, 217, 141-164.
- Kahkonen, M. ; Gnipenberg, v. ; carllerg, g. ; meretoja, i. And sorga, m. (1979). Mutagenicity of *Bacillus thuringiensis* exotoxin 3 sister chromatoid exchange in rats in vivo. Hereditas 91, 1-4
- Krieg, A. (1964). Uber die binenvertraglichkeit verschiedener industrie –preparate des *Bacillus thuringiensis*. Anz. Schadl-kde. 37. 39-40.
- Krieg, a. (1967). Neues uber *Bacillus thuringiensis* und seine anwendug. Mitte. Biol. Bundesanalt fur land und forstwirtschaft berline-dahlem heft 125, 106 pp.
- Lammana, C. and Jones, L. (1963). Lethality for mice of vegetative and spore forms of *Bacillus cereus* and *Bacillus cereus*-like insect pathogens injected intraperitoneally and subcutaneously. J. Bacteriol 85, 532-535.
- Marchal, S.D. (1975a). Role des laves entomophages dans l'infection a *Bacillus thuringiensis* des chenilles de "*Pieris brassicae*" L.

et "Anagasta kuekniella" zell. Rev. zool. Agr. Pathol. Vegetale 74, 68-84.

Marchal, S.D. (1975b). Development laravaire des hymenopteres parasites, apanteles glomeratus L. et phanerotoma flavitestacea F. chez des chenilles infectees par Bacillus thuringinsis berliner. Ann. Parasitologie. Humaine et comparee 50, 223-232.

Meretoja, T. ; Carlbeg, U. ; Linnainmela, K. and Sora, M. (1977). Mutagenicity of Bacillus thuringinsis exotoxin. Part 1. Mammalian test. Hereditas 85, 105-112.

Nakabayashi, T. and Ikezaiva, h. (1984). Release of alkaline phosphodiesterase from rat kidney by the specific phospholipase C of Bacillus thuringinsis cell struct. Funct. 9, 247-26.

Nishiitsutsuji-Uwo, J. ; Endo, Y. and Himeno, M. (1980). Effect of Bacillus thuringinsis delta-endotoxin on insect and mammalian cells. Appl. Entomol zool. 15, 133-139.

Salama, H. S. ; Zaki, F.N. and Sharaby, A. (1982). Effect of Bacillus thuringinsis Berl. On parasites and predators of the cotton leafworm spodoptera littoralis (Boised.). Z. ang. Ent. 94, 498-509.

Salama, H.S. and Zaki, F.N. (1985). Biological effects of Bacillus thuringinsis on the egg parasitoid trichogramma evanescens westw. Insect sci. applic., 6 (2), 145-148.

Sneh, B. ; Gross, S. and Gasith, A. (1983). Biological control of spodoptera littoralis (Boisd.) by Bacillus thuringinsis subsp. Entomocidus and bracon hebetor say (Hymenoptera, Brachonidae). Z., ang. Ent. 96, 408-412.

Teguchi, R. ; Asani, Y. and Ikezawa, H. (1985). Ectoenzyme release from rat liver and kidney by phosphatidylinostiol – specific phospholipase C. J. Biochem. (Tokyo) 97, 911-922.

Thomas, W.E. and Ellar, D.J. (1983). Bacillus thuringinsis var. israelensis crystal delta-endotoxin effects on insect and mammalian cells in vitro and in vivo". J. Cell sci. 60, 181-189.

الباب السابع

إدارة المقاومة لتوكسينات باسيليس ثورينجينسيز

مقدمة: حاجة الإنسان لمكافحة الحشرات قديمة قدم وجودة على وجه الأرض. الحشرات تزعج البشر من خلال العض والوخز واعتراضها الطريق مما يزيد من استمرارية مطالبته بالمكافحة من منطلق ان الحشرات تقوم بنشر الامراض للانسان مثل الملاريا والحمي الصفراء وكذلك زيادة الزراعة. مع زيادة تعداد سكان العالم زادت الحاجة لمجابهة الحشرات والسيطرة على الفقد الذي تحدثه والذي يصل في المتوسط على مستوى العالم ٤٣% في مقابل ١٣% على مستوى امريكا مع المحاصيل التي يستهلكها الانسان وهي قيمة عالية (Miller ١٩٩٨). لقد تغيرت محاولات الانسان في مكافحة الآفات من الطرق الطبيعية الى الكيمياءات المخلقة والان حدثت عودة الى الطرق الطبيعية مرة اخرى. من حسن الطالع ان المبيدات الحشرية المخلقة الموجودة حاليا في الاسواق يفترض امانها وقلة ثباتها عن المركبات القديمة مثل الددث. التعرض طويل المدي للمبيدات المخلقة حديثا وجد مرتبط بحدوث السرطان وتلف الكبد والسمية المناعية وقصور المواليد علاوة على المشاكل التناسلية والتكاثر في الانسان و الحيوانات (تيجلي ووايز ١٩٩٨). هذا يوضح اهمية تطوير الطرق الحيوية الطبيعية لمكافحة الحشرات أو ما يعرف بالمبيدات الحيوية وهذا هو الاتجاه الحالي. من اكثر المبيدات الحيوية انتشارا بكتريا باسيليس ثورينجينسيز (B.t.) وهي تنتج بروتينات تبيد الحشرات خلال التجريم. بكتريا التربة هذه وجدت بشيوع كبير في غبار الحبوب في الصوامع ومعدات تخزين الحبوب الاخرى حيث اكتشفت لأول مرة في اليابان ١٩٠١ بواسطة الباحث Ishawata وبعد ذلك في المانيا بواسطة Berliner (Baum وآخرون ١٩٩٩). لقد وجدت الاف سلالات B.t. (Lereclus ١٩٩٣). كل سلالة تنتج بلورات البروتين الخاصة بها التي تبيد الحشرات او الدلتا-اندوتوكسين. النشاط الابادي للتوكسينات من كل سلالة تختلف عن الاخرى. الدلتا-اندوتوكسين تشفر بجين فردي على البلازميد في بكتريا (Whalon and Mcgaughey ١٩٩٨). حزمة اندوتوكسينات Bt تؤثر على انواع مختلفة من رتب حشرية مثل غمدية الاجنحة (الخنافس) وحرشفية الاجنحة (الفراشات وابي دقيقات) وثنائية الاجنحة (الذباب والبعوض). كذلك وجد ان بعض دلتا-اندوتوكسينات Bt ذات سمية تساوي سمية بعض المبيدات الفوسفورية الشائعة. من ناحية اخرى فانه على خلاف المبيدات الفوسفورية والتي لها تاثيرات عامة فان توكسينات Bt متخصصة جدا لبعض الحشرات الضارة ومن ثم

تكون امينه على معظم الحشرات النافعة والحيوانات الأخرى. بالإضافة الى ذلك فان توكسينات Bt قابلة للانهيار الحيوي biodegradable ولا تظل ثابتة في البيئة.

الخلفية التاريخية والتطور الزمني للباسيليس Bt:

لقد أصبحت Bt متاحة تجاريا لأول مرة كمبيد حشري في فرنسا عام ١٩٣٨ ثم دخل امريكا على نطاق تجاري في الخمسينات. لسنوات عديدة تم تجهيز Bt بداية كى يلائم الرش على المحاصيل. بسبب عدم الثبات في Bt كان لزاما وضرورة تكرار المعاملة في المراحل الاولى من ادخال هذه الوسيلة الحيوية في مكافحة الآفات . في الثمانينات حدث نمو سريع في اتجاه الاستخدامات التجارية لمستحضرات Bt على نفس نسق المبيدات الحشرية المخلقة التى بدأت تفقد فعاليتها بسبب تطور المقاومة في الحشرات المستهدفة او لعدم ملائمتها مع القيود البيئية الوافدة وكذلك بسبب نمو مجال الهندسة الوراثية. في عام ١٩٨٧ ظهرت اول تقارير عن ادخال الجينات التى تشفر الدلتا-اندوتوكسين للباسيليس Bt في النباتات. لقد كانت النباتات المهندسة وراثيا الاولى التى تم تعبير توكسينات Bt هي الدخان والطماطم. النباتات الاولى التى ادخل فيها المبيد Bt هي الذرة البكتيري سجلت في امريكا بواسطة وكالة حماية البيئة الامريكية EPA عام ١٩٩٥ (USEPA ١٩٩٩ ب). الان سادت النباتات المهندسة وراثيا بالبكتريا Bt لتشمل الذرة والبطاطس والارز. هندسة النباتات لتعبير عن دلتا-اندوتوكسين Bt ذات فائدة خاصة ضد الآفات التى تهاجم الاجزاء النباتية التى يصعب حمايتها جيدا بتطبيق المبيدات الحشرية التقليدية. المثال الواضح عن هذا الوضع الحماية ضد ثاقبة الذرة الاوربية. يرقات هذه الحشرة التابعة لرتبة حرشفية الاجنحة تنقب في ساق نبات الذرة وتحطم العود. بمجرد دخول الحشرة تصبح في ما من المبيد. مع التوكسينات الموجودة في النباتات المهندسة وراثيا تتعرض اليرقات للسم ومن ثم يتم السيطرة على الضرر (Ely ١٩٩٣). بسبب فوائد كهذه اصبح Bt ذات وجود اساسي في الزراعة. في عام ١٩٩٧ غطي القطن البكتيري Bt والذرة Bt والبطاطس Bt ما يقرب من ١٠ مليون اكر في امريكا وحدها. لقد تم التوزيع والتسويق التجاري لهذه المحاصيل بشكل عريض في كندا، اليابان، المكسيك، الأرجنتين واستراليا (Frutos وآخرون ١٩٩٩). بالرغم من شيوع استخدام البكتريا Bt في صورة نباتات مهندسة وراثيا فان رش مستحضرات BT مازالت واسعة الانتشار ايضا.

كيفية احدث الفعل Mode of action: بكتريا Bt تسبب موت مباشر في الحشرات كما ان عزلات التوكسين من السلالات المختلفة اظهرت نفس طريقة احدث الفعل. بعد تناول بلورات الدلتا-اندوتوكسين فانها تذوب في معدة الحشرة ثم تحرر التوكسينات الاولى التي تعملها. هذه التوكسينات تتحلل بروتينيا الى اجزاء احدها يرتبط بخلايا الغشاء الطلائي للمعدة. البروتين المنشط يحدث خلل في التوازن الاسموزي لهذه الخلايا من خلال تكوين نقوب في جدران الخلية مما يسبب تحلل الخلايا (Van Rie) Lyse واخرون (١٩٩٢). بعد ذلك يحدث شلل في المعدة ثم تتوقف الحشرة عن التغذية وبعدها تموت معظم الحشرات خلال ساعات قليلة من تناول (مارون وماكنتوش ١٩٩٣). قدرة الارتباط لوحدات التوكسين هذه ترتبط مباشرة بالسمية وهذا يعني ان الارتباط لا يعني ضرورة حدوث السمية.

توكسينات Bt:

يوجد ٣٤ تحت نوع من الباسيليس ثوريينجيسنيز Bt من اكثرها شيوعا تحت النوع كورسنتاكي (ضد حشرية الاجنحة) واسرائيلينسيز (ضد ثنائية الاجنحة خاصة البعوض والذباب الاسود) وتحت النوع تينبيريونيس (ضد غمدية الاجنحة). لقد تم عمل نوعين من البروتينات البلورية ذات الابداء الحشرية من هذه تحت الانواع المختلفة وتم تعريفها وهي Cyt (ستوليسينات cytoly sins اوليسينات خلوية) و cry (دلتا-اندوتوكسين بلورية Crystal delta-indotoxin). لقد قام هوفت وويتلي (١٩٨٩) بتعريف اقسام اربعة من جينات الكراي cry وقسمان من جينات cyt التوكسينات cry I, cry II فعالة ضد غمدية الاجنحة. بينما تنتج توكسينات cryIII بواسطة تحت النوع تينبيريونيس وتولويرثي وينتج cryIV بواسطة تحت النوع اسرائيلينسيز فانه بوجه عام وجد ارتباط قليل جدا بين بعض التوكسينات وبعض تحت انواع الباسيليس الموجودة. توكسينات الكراي Cry ترتبط بمستقبلات خاصة على الخلايا في معدة الحشرة. جينات cyt فعالة ضد حشرات ثنائية الاجنحة والغمدية كما اظهرت بعض الفاعلية ضد حشرات نصفية الاجنحة (البق الحقيقي) والصراصير والنمل (Frutos واخرون ١٩٩٩). توكسينات cyt على خلاف توكسينات cry لم تتميز مع مواقع ارتباط خاصة (Lereclus واخرون ١٩٩٣).

المقاومة للمبيدات الحشرية Insecticide Resistance :

بالرغم من ان بكتريا Bt تختلف عن المبيدات الحشرية التقليدية في الاصل وكيفية احدث الفعل فانها مازالت تعاني بعض المشاكل التي يعانيها أي مبيد. المشكلة الكبرى التي تجابه مكافحة الحشرات بالمبيد الحشري هو تشود وتطور المقاومة في الحشرات لهذا المبيد. الحالات الاولى التي سجلت عن المقاومة للمبيدات المخلفة الرائدة بفعل الحشرات حدثت منذ ما يزيد عن ٥٠ سنة مضت. بعدها بثلاثين عاما أي في عام ١٩٧٩ اعلن برنامج البيئة التابع للأمم المتحدة ان ظهور المقاومة لفعل المبيدات تعتبر من اكبر المشاكل البيئية الخطيرة. الخطورة تنبئ من المشاكل الخاصة بالامن الغذائي حيث ان المقاومة للمبيدات معناها زيادة الفقد الذي تحدثه الآفات وانتشار الامراض بواسطة الحشرات المقاومة وادخال مبيدات جديدة اكثر سمية وضررا على البيئة بعد تطور المقاومة للأنواع التي كانت سائدة و استخدام كميات اكبر واكبر من الكيمائيات التي تطورت مقاومة ضدها فعلا (Pimentel and Burgess ١٩٨٥).

كيف تستطير المقاومة ؟ لقد نجحت الحشرات في تطوير المقاومة لكل نوع من المبيدات تقريبا. المقاومة للمبيدات الاخرى اعطت الفرصة للباصيليس ثورينجيسيز كي تفرض نفسها في مكافحة الآفات وتصبح من بين الوسائل الحيوية الشائعة في برامج ادارة الآفات . لقد تطورت المقاومة للمبيد الحشري بسبب الاختلافات الوراثية في المجاميع الكبيرة للحشرة. قليل من الافراد في المجموع الاصلي للحشرة لا تتأثر بالمبيد تحت التناول. بوجه عام فان الافراد التي لم تتأثر (المقاومة) تختلف عن الافراد التي تتأثر (الحساسة) سواء في طبيعة الهدف الذي تعمل عليه جزيئات المبيد في الحشرة او في الطريقة التي تعمل بها الحشرة على تكسير الجزيئات السامة للمبيد (Michaud ١٩٧٧). عندما يستخدم المبيد الحشري فان الافراد الذين لم يتأثروا بالمبيد تمثل الافراد التي تستمر في الحياة لنقل جيناتها للأجيال التالية. مع مرور الوقت يزداد نسبة الافراد التي لم تتأثر بالمبيد يوما بعد يوم. بالاضافة الى الضرر الذي يحدث من جراء زيادة اعداد الافراد المقاومة فان محاولات السيطرة على المقاومة في الحشرة قد تتسبب بشكل غير مباشر في الظهور الوبائي وما يستتبع ذلك من زيادة الضرر و التلف على النباتات (Hoy ١٩٩٨).

العوامل التي تؤثر على المقاومة:

توجد عوامل عديدة تزيد من معدل تطور المقاومة للمبيد من قبل الحشرات. بعض العوامل ترتبط بمجموع الحشرة نفسها : الأنواع ذات معدلات التناسل العالية، فترات

قصيرة الجيل، اعداد كبيرة من النسل، وبشكل اكبر فانه يتطور مجموع اكثر مقاومة وبسرعة من المجاميع المحلية المختلفة وراثيا. بصرف النظر عن ان الاساس الوراثي للمقاومة في الحشرات سائد او متنحي فانه يمثل اهمية. العوامل الاخرى تعتمد على المبيد نفسه. المقاومة تتطور بسرعة اكبر مع المبيدات الحشرية الاكثر ثباتا، استمرار فاعلية المبيد في البيئة يزيد من فرص تعرض الافراد الحساسة للتوكسين ثم تموت، لذلك لا توصل الصفات والعلاقات الخاصة بين المبيد والسلالة الحساسة الى الجيل التالي. هذا الانتخاب يحدث بقوة مع الحشرات المقاومة لانها هي الوحيدة التي تستمر في الحياة. على نفس النسق والمفهومية فان الاستخدام المتكرر للمبيدات غير الثابتة يؤدي الى نفس التأثير (Wood 1981). كذلك فان مجاميع الحشرة ذات التغيير القليل في حزمة الجين في الافراد الجديدة الحساسة غير المعرضة تطور مقاومة كذلك بشكل اسهل (Comins 1977). المجاميع التي تعرضت في الماضي لمبيد حشري ذات طريقة احداث فعل مشابه لتلك التي يحدثها المبيد الحشري الجديد تكون مقاومة بسرعة للتوكسين الجديد. تعرف هذه الظاهرة بالمقاومة المشتركة (pimentel and Burgess 1985).

تطور المقاومة لبكتريا الباسيلليس ثورينجيسيز:

السؤال المطروح في البداية يقول ويستفسر عن أهمية هذا الموضوع. كما لوحظ قبلا فان مشكلة تطور المقاومة للمبيدات تمثل مشكلة كبيرة وحقيقية ليس في المجال الزراعي فقط ولكن في الصحة والاقتصاد كذلك. تطور المقاومة للباسيلليس ثورينجيسيز أو لتوكسينات Bt تعتبر من قبيل سوء الحظ. توكسينات Bt اكثر تخصصية للافه واكثر امان بيئي بالمقارنة بالمبيدات الحشرية التقليدية ولكنها فعالة ضد الحشرات المستهدفة. لهذه الاسباب اصبحت مستحضرات الرش ببكتريا Bt متاحة لمزارعي الزراعة العضوية كاحدي اهم وسائل مكافحة الحيوية. اذا اصبحت المنتجات Bt غير فعالة بسبب المقاومة فسوف تفقد الزراعة العضوية مصدر هام لا يمكن تعويضه او الاستغناء عنه. قد يتسائل البعض عن اهم التقارير التي اشارت الى مقاومة الحشرات لفعل مستحضرات بكتريا Bt. في عام 1985 تم نشر اول دليل عن تطور المقاومة للدلتا-اندوتوكسين Bt. لقد وجدت مستويات منخفضة من المقاومة في حشرة فراشة الدقيق الهندية في مخازن الحبوب المعاملة ببكتريا Bt. لقد اتضح في ظروف تخزين كهذه انه قد تتكون مقاومة في هذه الحشرة للباسيلليس خلال موسم واحد فقط. قبل ذلك لم تسجل حالات مقاومة للدلتا-اندوتوكسين Bt لا في المعمل ولا في الحقل وكانت هناك جهود كبيرة لانتخاب السلالات

المقاومة في المعمل (Mr Gaughey ١٩٨٥). لقد امكن تمييز الاحتمالات العالية لتطور المقاومة ضد Bt وتوكسيناتها عندما صدر التقرير من هاواي-فلوريدا ونيويورك في امريكا عام ١٩٩٠ بعد ثلاثين عاما من الظهور الاول للبكتريا على المستوى التجاري. لقد وجد ان النوع الذي فقد حساسيته لتوكسين Bt كان بلونتيلا زيلوستيلا التي عوملت رشا بمستحضرات التوكسينات. في نفس الوقت ظهرت تقارير تفيد بمقاومة نفس الحشرة للبكتريا Bt بعد الاستخدام المكثف في الدول الاخرى مثل اليابان والصين والفلبين وتايلاند. صدر تقرير من ماليزيا عام ١٩٩٠ عن مقاومة الفراشة ذات الظهر الماسي وقد اكد الفلاحون هذه الظاهرة. لذلك يمكن القول ان هذه الحشرة قد تكون الوحيدة التي طورت مقاومة ضد Bt خارج المعمل.

خلال الخمسة عشر عاما منذ اكتشاف المقاومة في حشرة *p.interpunctella* حدث انتخاب في مجاميع المعمل للمقاومة لبكتريا Bt لما يزيد عن ١٣ نوع من الحشرات. لقد طور النوع من الحشرات مقاومة لمختلف السلالات من توكسين Bt في المعمل وليس في الحقل ومنها ثاقبة الخرة الاوربية، دودة براعم الدخان، دودة اللوز القرنفلية، بعوض الكيوليكس، الفراشة الماسية، خنفساء اوراق القطن، الفراشة الغجرية، خنفساء كلورادو البطاطس وبعوض الحمي الصفراء. لقد اختبرت انواع اخرى في المعمل وظهرت محتفظة بالحساسية لبكتريا Bt. بينما كونت وطورت بعض الانواع مقاومة في المعمل ولم يظهر أي منها مقاومة في الحقل. هذه النتائج يجب ان تلقى الاهتمام على غرار ما حدث عام ١٩٨٥، ١٩٩٠.

ميكانيكية المقاومة Mechanism of Resistance:

كي نتعامل مع بكتريا Bt لابد من فهم التقنيات او الميكانيكيات التي تقاوم بها الحشرات فعل البكتريا وتوكسيناتها. التقنيات التي تقاوم بها الحشرة التأثيرات السامة لتوكسينات بكتريا Bt من الطبيعي ان تكون مرتبطة بكيفية احداث فعل Bt. كما سبق القول فان التوكسينات الاولى للبكتريا Bt protoxins تنشط بواسطة انزيمات البروتيزيس proteases في معدة الحشرة وبعد التنشيط ترتبط بالمستقبلات على الغشاء الطلائي. لذلك فانه بعد ذلك تحدث عدد من الخطوات تؤدي الى موت الحشرة. ان تخصصية طريقة احداث الفعل معقدة وتختلف فيما بين الحشرات وسلالات Bt شديدة التعقيد تمشيا مع حقيقة انه فيما قبل ١٩٨٥ كان يظن ان التعقيدات نفسها سوف تمنع من تطور المقاومة.

ميكانيكيات المقاومة معقدة بنفس القدر بسبب ان العديد من الخطوات تشترك في العملية الكلية لاحداث الفعل بواسطة Bt كما ان هناك العديد من طرق ايقاف العملية ومقاومة التوكسين. لقد درست الميكانيكية الفعلية للمقاومة في القليل من انواع الحشرات حيث تم انتخاب الافراد المقاومة في المعمل. اظهرت الدراسات ان اكثر تقنية وميكانيكية للمقاومة تتضمن التغيير في مستقبلات الغشاء والتي يحدث بسببها تنشيط للتوكسينات حتي ترتبط عليها. في حشرة بلونليا زيلوستيلا يكون خفض ارتباط التوكسين هي التقنية الوحيدة للمقاومة (Tabashink واخرون ١٩٧٧). اظهرت دراسة اجريت عام ١٩٩٢ ان المقاومة لتوكسينات Bt cryIAb ترتبط بالخفض في عدد مستقبلات cryIAb في المعدة (فانري واخرون ١٩٩٢). لقد اتضح ان *p.interpunctella* تملك تقنية خفض الارتباط بدرجة خفض ٥٠ مرة في ارتباط cry IA المرتبط مع خفض ١٠٠ مرة في السمية. هذا لا يعني وجود قليل من مواقع الارتباط في السلالة المقاومة من الحشرة ولكن ببساطة شديدة اقل مقدرة على الارتباط. بالاضافة الى نقص المقدرة على الارتباط فان المقاومة في هذه الحشرة ترتبط بغياب بروتينينز المعدة. من المفترض ان هذا البروتينيز يرتبط بالانقسام بانزيمات تحلل البروتين وتنشيط التوكسينات الاولية لبكتريا Bt (Oppert واخرون ١٩٩٧).

التقنيتان التي ذكرت اعلاه عن المقاومة وهما خفض ارتباط التوكسين/مواقع الارتباط ونقص تنشيط التوكسين كان يعتقد انهما يحدثان معا في دودة اللوز الامريكية (Michaud ١٩٩٧). الدراسات هذه ليست قاطعة النتائج حيث اظهرت دراسة ١٩٩١ خفض في قابلية الارتباط للتوكسين cryIA وزيادة عدد مواقع ارتباط cryIA وزيادة عدد مواقع ارتباط CryIA في الافراد المقاومة وهي تتعارض مع الدراسة التي اوضحت زيادة في مقدرة ارتباط Cry IA ونقص عدد مواقع الارتباط للتوكسين Cry IA في الافراد المقاومة (مكنتوش ١٩٩١ وتاباشفيك ١٩٩٤-ب). في النهاية اظهرت حشرة دودة البراعم *c.fumiferana* تقنيات مختلفة بشكل كامل للمقاومة توكسينات cry IA تفقد نشاطها بواسطة الترسيب مع معقد البروتين الموجود في المعدة (Michaud ١٩٩٧).

ادارة التعامل مع المقاومة Resistance Mangement:

اهداف وانواع ادارة التعامل مع المقاومة: لقد تكونت فناعة تامة بان المقاومة تعتبر مردود لا يمكن تجنب حدوثه مع استخدام أي مبيد حشري. هدف ما يعرف بادارة التعامل

مع المقاومة ليس إيقاف المقاومة كلية ولكن أحداث بطيء في تطورها وإطالة فترة حياة المبيد فعالة لأطول فترة ممكنة (comins 1977). بعض العلماء أصبحوا يفضلون الإشارة لهذا العلم بالمصطلح "تخفيف المقاومة Resistance mitigation" بدلا من إدارة التعامل مع المقاومة "Resistance management" لأن الأولى تصف طبيعة التعامل التي تقوم بها للتغلب على مشكلة المقاومة (Hoy 1998). من الضروري مضادة المقاومة كي نحافظ على فاعلية بكتريا Bt.

توجد ثلاثة أهداف لإدارة التعامل مع المقاومة:

- تجنب المقاومة حيثما وجدت وبقدر الامكان اذا كان ذلك ممكنا
- تأخير حدوث المقاومة لأطول فترة أمكن
- تحويل المجاميع المقاومة الى حساسة (Croft 1990).

لقد نفذت العديد من البرامج الخاصة بالتعامل مع المقاومة خلال الخمسة والعشرين سنة الماضية معظمها تناول بجدية الحفاظ على الحساسية لبكتريا Bt. النباتات المقاومة المهندسة وراثيا ببكتريا Bt زاد استخدامها ووجهت في اتجاه تطور المقاومة. النباتات المهندسة وراثيا تعرض الحشرات للتوكسينات باستمرار حتي في الاوقات التي لا تسبب خلالها ضرر اقتصادي (ماليت وبورتر 1992).

برامج إدارة المقاومة تستخدم في العادة واحد من ثلاثة اقترابات اساسية لتأخير المقاومة. احد الاقترابات تستهدف تقليل التعرض للتوكسينات و/او السماح بالتزاوج بين الحشرات المقاومة ومجموع كبير من الحشرات الحساسة لجعل والحفاظ على صفات الحساسية مستمرة في حزمة الجينات. هذه الاستراتيجيات تشمل التعبير عن التوكسينات في النسج المعين او في الوقت المعين، استخدام المخاليط، اطلاق الذكور الحساسة في الحقل في توقيتات او مناسبات معينة او بصفة دورية او غيرها. الاقتراب الاخر يركز على دمج طرق مكافحة بدرجة تفوق مقاومتها لاكثر من وسيلة على التوالي. الاستراتيجيات في هذا الاقتراب تشمل تكديس الجين او جرعات عالية او مخاليط التوكسينات ذات طرق احداث الفعل كاملة الاختلافات وكذلك خلط جرعة واطية من التوكسين والاعداء الطبيعية. الاقتراب الاخير شديد الاختلاف في طبيعته عما ذكر قبلا. هذه الاستراتيجية تستخدم "المصائد النباتية trap plants" لجذب الآفات بعيدا عن المحاصيل.

الحفاظ على المجاميع الحساسة كي تتزاوج مع الافراد المقاومة:

اطلاق الحشرات الحساسة في المجموع المعرض: من بين الاستراتيجيات القديمة تلك التي تضمنت تزاوج الحشرات المقاومة مع الحساسة. بساطة هذه الافكار تتمثل في الاطلاق الدوري للذكور الحساسة المرباة في المعمل او المجموعة من مكان ما في المجموع المعامل ببكتريا Bt. من الناحية النظرية فان هذا الاسلوب يجعل من الممكن الحفاظ على تكرارية المقاومة في المجموع تحت المستوي الذي حدد سابقا (Curtis 1981). هذه الطريقة يفضل استخدامها على مجاميع الحشرات مثل البعوض والتي فيها تستهدف المبيدات الحشرية الاناث (Wood 1981). بكتريا Bt ليست مبيد متخصص لجنس ما (اناث او ذكور) مع وجود خطر من موت العديد من الذكور الحساسة التي تم اطلاقها في حقول البكتريا Bt قبل التزاوج. بالاضافة الى ذلك فان جدوي تربية ونقل مستعمرات كبيرة محل تساؤل.

المأوي Refugia:

بناء على الاستراتيجية البسيطة التي وضعت اعلاه فان العديد من البرامج تضمنت نشر مجموع الحشرات الحساسة على امل ان تنتشر في المجموع المعامل وتتزاوج مع افراد. هذا هو اساس استراتيجية المأوي refuge strategy. المأوي قد يختلف في الحجم و المكان وهو يعتبر مخزن للحشرات الحساسة. من الناحية النموذجية فان العديد من الافراد الحساسة سوف تتزاوج مع قليل من الافراد المقاومة مما يخلق معدل قليل جدا من المقاومة الشاملة في الاجيال التالية. نجاح استراتيجية المأوي يعتمد على اربعة ظروف: ان تكون صفة المقاومة متنحية، هناك تزاوج عشوائي، الحشرات الكاملة تتحرك بشكل كافي بين النباتات السامة، هناك قصور في الفعل الابادي ضد الحشرات في المأوي. اذا لم تتحرك الحشرات الكاملة بين المأوي والمناطق المعاملة فان المقاومة تتطور سريعا في المناطق المعاملة بينما يستمر المجموع الحساس في التزاوج مع بعض في المناطق غير المعاملة. اذا تعرض المأوي لاي نوع من المبيدات سوف ينخفض تزاوج المجموع الحساس المتاح للتزاوج مع الافراد المعرضة لبكتريا Bt (Tabashnik 1977). المأوي الموجود على طول المساحات المعاملة وخارج للحقل يكون اكثر نجاحا عن خطوط النباتات المأوي التي تزرع في الحقل مع خطوط نباتات البكتريا Bt. كلما كبرت مساحة المأوي يتأخر حدوث المقاومة على المدى الطويل (frutos 1999). المقاومة سوف تتطور حتما عندما تؤدي هجرة الافراد المقاومة في المجموع الحساس الى وصول

المجموع المقاومة في النهاية في المساحات غير المعاملة الى نسبة عالية بما يحافظ على توازن المأوي كما صممت في البداية (comins 1977). لقد تمت التوصية بان تكون مساحة المأوي تغطي 5 الى 10% من المساحة الكلية للمحصول في دراسة اجريت عام 1992 (Mallet and Porter 1992). اظهرت نماذج الحاسب الالى باستخدام المعلومات عن دورة حياة حشرات حرشفية الاجنحة ان مساحة المحصول مع 10% مأوي اخبرت المقاومة حتى 5 الى 1120 جيل (Tabashnik 1994-أ). لقد اثبت برنامج 10% مأوي الاسهام في استمرار حساسية حشرة X.xylostella لتحت انواع الباسيلليس Bt aizawai. هناك انواع اخري من الحشرات لم تستجب بنفس القدر لاستراتيجية المأوي بهذا الحجم (Liu and Tabashnik 1997).

بينما تمثل استراتيجيات المأوي نجاحا من المفهوم العام الا ان الربط والارتباط بين ما يحدث في الدراسات العملية وما يحدث في الحقل المتباين ليس من السهل التنبؤ به. في عام 1999 اظهرت احدي الدراسات ان التزاوج العشوائي قد لا يمثل بالضرورة فرضية امنة للحشرات في الحقل. مجاميع دودة اللوز القرنفلية المقاومة لبكتريا Bt تستغرق في المتوسط 5,7 يوم اكثر لتكوين تطور كامل من المجاميع الحساسة. بسبب ان اكثر من 80% من مجاميع الحشرة تتزاوج خلال 3 أيام من الفقس والخروج وتموت بعد التزاوج فورا فان ذلك يكون في صالح التزاوج المتناسق وليس العشوائي. الافراد الحساسة سوف تتزاوج مع بعضها حتي قبل ان تفقس الافراد المقاومة (Liu وآخرون 1999). بالطبع فان الدرجة التي عندها تتأثر استراتيجيات المأوي مع حشرة دودة اللوز القرنفلية في الحقل تعتمد على تداخل الاجيال وربما على عوامل اخري ايضا. هناك عامل اخر يصعب التنبؤ به وهو هجرة الحشرات الكاملة عندما تتاح لها فرصة التزاوج. هذه المعلومات مفيدة في اتخاذ قرار أي الاماكن افضل كمأوي. ان استراتيجيات المأوي وغير كاملة ولكن نجاحها يتأتى من البيانات المتاحة عنها. من الاهمية بمكان ان نتذكر ان المجموع الحساس يعتبر مصدر يمكن استنزافه (wood 1980). طريقة المأوي غالبا تستخدم بالدمج مع غيرها من الاستراتيجيات لزيادة كفاءة كلا الوسيلتين. من المشاكل التي تدخل تحت نطاق سوء الحظ عدم ترحيب الفلاحين لترك مساحة جانباً تعمل كمأوي دون زراعة. هذا قرار صعب اتخاذه بسبب المقارنة والمنافسة بين الفلاحين (Mallet and porter 1992).

مخاليط النباتات seed Mixtures: مخاليط النباتات على غرار المأوي تعمل على تأخير المقاومة من خلال صيانة المجموع الحساس من الحشرة للتزاوج. زراعة الحقل باستخدام

هذه الاستراتيجية سوف تؤدي الى خلط عشوائي للنباتات المهندسة وراثيا ببكتريا Bt ونباتات خالية من التوكسينات. لقد اجريت دراستان لتحديد كفاءة مخاليط النباتات مقارنة بالماوي refugia. لقد استخدم ماليت وبورتر (١٩٩٢) نمجة الحاسب الالى لتوضيح ان مخاليط النباتات تسرع من تطور المقاومة بالمقارنة بالحقول المحتوية على نباتات سامة لوحدها. بعد سنتان اظهرت دراسة معاكسة ان مخاليط النباتات افضل من الحقول ذات النباتات النقية ببكتريا Bt. لقد اتفقت الدراستان على ان استراتيجية الماوي اكثر نجاحا من اسلوب خلط النباتات وفي العديد من الحالات اتضح انها سياسة الماوي مع خلط النباتات تكون اكثر نجاحا من خلال برنامج واحد. السبب في الاداء غير الجيد لاسلوب خليط النباتات كاستراتيجية لمجابهة المقاومة يرتبط عن قرب بالميزة النظرية لمخاليط النباتات. بينما تستطيع الافراد المعرضة و المقاومة بسبب احتوائها على بكتريا Bt كما ان سهولة انتقال الافراد جعلت الحشرات الحساسة في خطر من جراء التعرض الفائق لبكتريا Bt من النباتات المجاورة. ان العمل في صالح مخاليط النباتات يتمثل في دور سلوك بعض انواع الحشرات في تفضيل النباتات الخالية من التوكسينات عن النباتات المهندسة وراثيا ببكتريا Bt مما يخفض من التغذية في الحشرات الحساسة المعرضة لنباتات Bt. لقد لوحظ هذا السلوك في المعمل مع مجاميع حشرات دودة اللوز الامريكية. نحن لا نعلم عن مدى هذا السلوك في الحقل ولا استجابة الانواع الاخرى تجاه هذا السلوك (ماليت وبورتر ١٩٩٢).

الموزايك:

هو يعني قطع زراعية معاملة بيكتريا Bt واخري غير معاملة Mosaics: هذا الاقتراب يمثل استراتيجية المأوي في ان كلاهما يتضمن قطع من الحقول بها نباتات مبيكة patchwork of Bt ومساحات اخري غير المعاملة بالبكتريا تعامل بمبيدات اخري او سلالة اخري من البكتريا Bt او تكون غير معاملة بشكل كافي. كي تصبح هذه الاستراتيجية فعالة يكون من الاهمية عدم حدوث مقاومة مشتركة cross resistance بين نوعي المبيدات (بمعني ان المقاومة لوحد منها يجب الا يرتبط ايجابيا او يساعد في تطوير المقاومة للمبيد الاخر) (Tabashnik ١٩٩٤ ب). في الحقيقة يفضل ان تكون المقاومة المشتركة سالبة (Hoy ١٩٩٨). النموذج على غرار استراتيجية المأوي يعتمد على فرضية حدوث انتقال او هجرة كافية للحشرات بين القطع الحقلية للموزايك. استراتيجية الموزايك تعرضت لقليل من التقييم التجريبي ولكن النماذج انت الى الاقتراح بانها غير مفيدة لانه يمكن ان تنتهي العملية بالانتخاب المتزامن للمقاومة ضد كلا التوكسينات بدلا من تاخير حدوث المقاومة لكليهما. هناك دراسة واحدة فقط عضدت نموذج واقتراب الموزايك. اظهرت هذه الدراسة انه اذا كان مجموع حشرات البعوض موزع بتجانس عبر موزايك من مبيدين على نفس القطر من الفاعلية واذا كانت معدلات الهجرة والاستقرار متساوية في كل القطع التجريبية الحقلية فان الموزايك يستطيع تاخير تطور المقاومة في الحشرات.

الدورات Rotations: بديل استراتيجية الموزايك تتمثل في اقتراب الدورات. في هذا النظام يتم ترتيب استخدام مبيدين حشريين او اكثر بشكل مؤقت اكثر منه مكاني spatially. استخدام المبيدين او اكثر بالتتابع وليس بالتزامن اظهرت كفاءة في تاخير المقاومة بشكل نسبي (Wood ١٩٩٨). على غرار الموزايك فان الدورات لايمكن ان تنجح اذا كان هناك مقاومة مشتركة بين المبيدات الحشرية. منطقية الدورات تتمثل في انه بسبب وجود تكاليف مرتبطة بالمقاومة فانه وحينما لا يتعرض مجموع الحشرات للمبيد فان تكرارية حدوث المقاومة لهذا المبيد سوف تنخفض (Hoy ١٩٩٨). لسوء الحظ فانه لوحظ انه بعد استبعاد الضغط الانتخابي للمقاومة لبكتريا Bt (خلال الفترات التي يستخدم فيها بكتريا Bt) فان تكرارية حدوث المقاومة في المجموع تظل ثابتة او تتناقص ببطيء شديد. بالاضافة الى ذلك فان التكاليف المرتبطة بتطور المقاومة عادة ما تهمل لذلك فانه يجب

عدم اعتبار الضغط الانتخابي في الافراد الحساسة لبكتريا Bt خلال فترات الدورات بدون بكتريا Bt.

التعبير عن التوكسين في النسيج الخاص او الوقت الخاص: هذا الاقتراب يدخل تحت نطاق استراتيجيات الادارة والتي تستهدف لتقليل التعرض الزائد لبكتريا Bt من خلال هندسة النباتات وراثيا كي تعبر عن جينات التوكسين فقط في اوقات الحاجة او في اجزاء النباتات فقط ذات الأهمية الاقتصادية أو إجبارية أكثر لهجوم الآفات (Frutos واخرون ١٩٩٩). هذا الاقتراب يشابه نظام الماوي و خلط النباتات في ان النباتات نفسها تقدم ماواها الذاتي. يجب ان تطور النباتات لانتاج توكسينات فقط بعد حد حرج للضرر. في اتجاه التعبير في نسيج خاص فان الدراسات عن التداخل بين آفة خاصة والنبات المستهدف ادت الى الاقتراح بتطوير الاستراتيجيات. على سبيل المثال فان نباتات القطن التي تهاجم بواسطة ديدان اللوز يجب ان تنتج توكسين فقد في انسجة اللوز الصغير وهذا هو الجزء الهام من النباتات. بالاضافة الى الحماية الخاصة للنسيج النباتي الحرج فانه قد يؤثر فقط على جيل واحد من ديدان اللوز (التي تعيش وقت اللوز الصغير) مما يجنب الضغط الانتخابي الثابت الذي يزيد و يسرع من تطور ونشوء المقاومة (Gould ١٩٨٨). التعبير عن النسيج الخاص قد لا يكون الاختبار المناسب لبعض الآفات والتي تستهدف داخل النبات مثل ثاقبة الذرة الامريكية (Monsanto ٢٠٠٠). مع معظم الانواع لا يعرف الا القليل عن سلوك الحشرات في الحقل ولذلك فان الطرق الفعالة للتعبير البكتيري Bt الموجودة في نسيج معين او وقت معين غير معروفة. بسبب التعبير عن توكسين خاص كما لوحظ اعلاه يقدم ماوي بطريقة مثل او مشابهة لخلط النباتات فان نفس النتائج السالبة قد تؤدي الى التعبير الخاص كما نتج مع خلط النباتات.

دمج او خلط طرق مكافحة الحشرة combining insect control methods

الاقتراب الثاني لادارة التعامل مع المقاومة بخلط او دمج العناصر القديمة والجديدة لقد افترض ان المقاومة تكون اقل حدوثا وتطورا لطريقتين من المكافحة بالتزامن عنه لطريقة واحدة. بالنسبة لطريقتين او وسيلتين فان تكون المقاومة للخليط اولهما معا بتأخر بالمقارنة في حالة استخدام كل وسيلة بمفردها في ترتيبات مؤقتة او وقتية. ان استخدام اثنان او اكثر من طرق المكافحة في وقت ما تعتبر نوع من الضمان او التأمين في حالة فقد احدهما الفاعلية او الكفاءة. على نفس النسق تتمثل طريقة زيادة الفاعلية للتوكسين

باستخدام جرعة عالية كما هو الحال مع استخدام جرعة واحدة في مكافحة الاولى وجرعة ثانية في الاخرى. هذا معناه اختلاف النظرية عن المؤلف.

استخدام مبيدات منفردة Use of Multiple insecticides:

بدأت هذه الاستراتيجيات من خلال الخلط البسيط لاثنين او اكثر من المبيدات الحشرية في نفس الحقل مثل توكسين Bt وتوكسين غير Bt. ضرورة هذا الاقتراب او العامل المحدد لنجاحه عدم وجود مقاومة مشتركة بين هذه المبيدات. من الصعوبة افتراض عدم وجود درجة من المقاومة المشتركة بين أي من ازواج المبيدات ولو ان الدراسات اثبتت حدوث هذه الظاهرة حتي بين المبيدات ذات طرق احداث الفعل المختلفة (Hoy 1998). لم تثبت أي من التجارب ان استخدام خلائط المبيدات بجرعات قاتلة يؤخر المقاومة للباسيلليس فيما عدا ان احد الدراسات اظهرت حدوث تنشيط باستخدام المنشطات synergists. المنشطات عبارة عن وسائل ليس من الضروري ان تكون قاتلة او سامة بمفردها ولكن عند استخدامها مع مبيد ما تزيد من سمية هذا المبيد. مثبطات بروتينز السيرين تزيد من سمية بكتريا Bt ضد بعض الانواع ولكن لا يوجد دليل ان هذه السمية العالية قلت من تطور المقاومة.

التكدس الجيني Gene stacking:

التكدس الجيني يشابه طريقة استخدام المخاليط ولكنها تتضمن فقط مخاليط من اثنين او اكثر من التوكسينات المختلفة Bt cry او Bt cry وتوكسين Bt cyt. تقدم التوكسينات متزامنة في نفس الوقت ولكن لكل منها مواقع ارتباط مختلفة في معدة الحشرة (Frutos وآخرون 1999). هذه الاستراتيجية مبنية على نفس الفرضيات والمعايير المعمول بها في خلائط المبيدات. لقد اظهرت بعض الدراسات ان توكسينات cry و cyt تعمل معا حيث يعمل cyt كمادة منشطة. في دراسة اجريت عام 1998 ساعد استخدام Bt cyt IAA في حشرة C. scripta (Frutos وآخرون 1999). على نفس المنوال فان الجرعات غير القاتلة لتوكسينات cytA عندما تدمج او تخلط مع توكسينات cry IV قد تخفض و/او تقلل من المقاومة حتي 1000 مثل في المجاميع المقاومة للتوكسين cry IV لحشرة c. quinquefasciatus (Wirth وآخرون 1997). لقد ظهرت ادلة كبيرة تضاد أي استراتيجية لاستخدام مخاليط من توكسينات cry المنفردة. لقد اظهرت حشرة بودة

اللوز الأمريكية مقاومة مشتركة للعديد من توكسينات Bt Cry من السلالات العديدة. لقد أظهرت حشرات *p. xylostella* و الأخيرة مقاومة في المعمل والحقل لخمس أو ستة توكسينات Bt cry بالتزامن. لقد تم التفسير الجزئي من خلال موجدات عام ١٩٩٧ من ان جين فردي في *pxylostella* مسئول عن المقاومة لاربعة توكسينات Bt Cry فردية. مع تضمين المأوي الخارجي تصبح هذه الاستراتيجية أكثر فاعلية عن الموزايك أو الدورات مع توكسينات cry المختلفة. تجدر ملاحظة انه حتى مع كمية صغيرة من المقاومة فانها قد تؤخر تكس الجين كاستراتيجية مما يجعل من الضروري تطبيق استراتيجية المأوي (Caprio ١٩٩٨).

هناك استراتيجية فعالة أخرى تتمثل في استخدام الاعداء الطبيعية بدلا من التوكسينات الأخرى في نظام خلط مع الجرعات الواطية من بكتريا Bt. لا يمكن ان تستخدم هذه الاستراتيجية مع معظم المبيدات الحشرية لان لها مدي عريض من التأثيرات وكذلك فانها تقتل الاعداء الطبيعية وكل الآفات. الاعداء الطبيعية المستخدمة قد تكون مفترسات أو اشباه الطفيليات. الفرضية تحت هذه الاستراتيجية ذكرت قبلا عند استعراض استراتيجيات الدورات. من الناحية النظرية فان تكاليف المقاومة سوف تجعل من الآفات المقاومة أكثر حساسية لهجوم الاعداء الطبيعية. أي عدو طبيعي يستخدم يجب الا يتأثر من جراء التعرض لبكتريا Bt. كجزء من البرامج العديدة للإدارة المتكاملة للآفات تستخدم جرعات واطية من بكتريا Bt بالتوافق مع الاعداء الطبيعية عندما لا تكون Bt قوية بما فيه الكفاية من حيث الجرعة التي تكافح الآفة. لقد تناولت احدي الدراسات في عام ١٩٩٧ التأثيرات السامة لخليط Bt في شبيه الطفيل *c.plutella* على الحشرة *p.xylostella*. التداخل بين الاثنين لم يؤثر بشكل معنوي كبير على الموت للحشرة المقاومة للباسبيليس Bt لذلك تأثرت المجاميع الحساسة بالخليط بدرجة أكثر من شبيه الطفيل أو Bt منفردة. لم تثبت اية دراسات في المعمل أو الحقل تطور مقاومة باستخدام بكتريا Bt والعدو الطبيعي معاً. كما ذكرت سابقا فان المقاومة لبكتريا Bt لم تظهر تكاليف محسوسة. اذا كان العدو الطبيعي يهاجم الآفات الحساسة والمقاومة أو يفضل الآفات الحساسة فانها قد تسرع من تطور المقاومة عندما تستخدم مع بكتريا Bt.

الجرعة العالية High dose: استراتيجية استخدام الجرعة العالية وضعت على امل ان تخفض المقاومة باستخدام جرعة عالية بما فيه الكفاية من التوكسين لقتل الحشرات غير

المتجانسة وهي التي تملك الليلات لكلا المقاومة والحساسية. الحشرات ذات الليلات المقاومة بها درجات مختلفة من المقاومة تعتمد على ما اذا كانت تحمل واحد او اثنين من الليلات المقاومة. من الناحية النظرية فان الجرعة العالية المتزايدة من التوكسين سوف تقتل حتي كل الافراد التي تكون فيها المقاومة متجانسة. الجرعة العالية بما يكفي لتكون قاتلة ١٠٠% ليست في الحسبان او ليست ذات جدوي. لذلك فان الجرعة العالية من ضمن استراتيجية تستهدف قتل الافراد غير المتجانسة (وكذلك تقتل الافراد المتجانسة ذات الليلات الحساسة). ان نجاح استراتيجية الجرعة العالية يعتمد على الليلات المقاومة النادرة او المتنحية او المتنحية جزئياً (Haung وآخرون ١٩٩٩). السيطرة على الجرعة بعناية يعتبر مفتاح هذه الاستراتيجية. اذا كانت الجرعة قابلة للانهياب فان الافراد الغير متمثلة وراثياً heterozygotes سوف تستمر في الحياة وتمر من على جين المقاومة. بالإضافة الى ذلك فان الافراد غير المتجانسة هذه ليست لها ميزة عن الحشرات المتجانسة وراثياً فيما يخص الليلات الحساسة او ان تطور المقاومة قد يسرع (curtis ١٩٨١). من الناحية التطبيقية فان استراتيجية الجرعة العالية يجب ان تدمج مع استراتيجية المأوي لتقديم افراد حساسة تتراوح مع الافراد المقاومة التي تبقى بعد استخدام الجرعة العالية. بالإضافة الى ذلك فان استخدام خليط من التوكسينات سوف يساعد في تأخير المقاومة لاحقاً. اعتبارات المشاكل المرتبطة باستراتيجيات المأوي و خليط التوكسينات يجب ان تؤخذ في الحسبان خاصة عندما تستخدم في خليط مع استراتيجية الجرعة العالية (Foutos وآخرون ١٩٩٩).

المقاومة بشكل عام وجدت ترجع الى صفة وراثية متنحية او متنحية جزئياً ولو ان بعض الأدلة اوضحت ان بعض الليلات المقاومة قد تكون سائدة او شبه سائدة. اظهرت احد الدراسات ان المقاومة للمستحضر البكتيري دايبيل ES وهو مستحضر رش لبكتريا Bt يستخدم توكسينات تحت النوع Berliner انه يرجع لصفة سائدة غير كاملة في حشرة O.nubilalis (Huang وآخرون ١٩٩٩). هذا الدليل يقوض فائدة استراتيجية الجرعة العالية. لم يتحصل على نتائج متشابهة مع دراسات المقاومة للنباتات المهندسة وراثياً والتي تستخدم توكسينات مختلفة (Tabashnik وآخرون ٢٠٠٠). هناك مشكلة اخري مع استراتيجية الجرعة العالية تتضمن الاعداء الطبيعية. اذا حدث منع او تخلص مؤقت من مجاميع الآفات فان الاعداء الطبيعية في النظام البيئي التي تتغذي على هذه الآفات ممكن ان تغادر المكان او تموت. هذا يترك موقع ومتسع فوراً ان الآفة الثانوية عندما تعود الآفات ولا يتم السيطرة طبيعياً على الآفات بصورة طبيعية بواسطة الاعداء الطبيعية (Hoy ١٩٩٨). لتحقيق الجرعات العالية يصبح في الامكان تطوير تخليق وتحفيز

توكسينات Bt. لقد درست طريقة حديثة تضمنت التعبير بالتوكسينات في اجزاء مختلفة من الخلية. مع نباتات الدخان التي هندست وراثيا للتعبير عن توكسينات cryII Aa2 في الكلوربلاست حدث خفض كبير في المقاومة في مجاميع ثلاثة انواع من الحشرات. اظهرت مقاومة كبيرة للتعبير النووي الخاص cry II Aa2 (Kota وآخرون ١٩٩٩).

المصائد النباتية Trap plants:

استراتيجية المصائد النباتية تشابه لحد ما سياسة المأوى refugia ولكنها تختلف من الناحية النظرية ومن ثم توضع في مرتبة خاصة بها وحدها. لقد طور اندو والسناد هذه النظرية عام ١٩٩٥ باستخدام نظم المحاكاة بالحاسب الآلي عن سلوك O.nubilalis. هذه الاستراتيجية تستخدم النباتات المهندسة وراثيا ببكتريا Bt وليس مستحضرات الرش. يتم زراعة جزء من نبات الـ Bt كمصيدة ويزرع بالقرب منه نفس المحصول العادي بدون هندسة Bt. النبات المهندس وراثيا بالبكتريا يزرع مبكرا وينضج مبكرا عن المحصول العادي ومن ثم يجذب الحشرات والتي تقتل حينئذ بواسطة التوكسين. بعد ذلك ينضج المحصول متأخرا ولكن يكون قد تم مكافحة الحشرات فعلا بواسطة مصيدة Bt. هذه الاستراتيجية تلائم حشرة o.nubilalis لان الفراشات تخرج في يونيو عندما يكون النبات في اولى مراحل نموه المبكرة بعد البيات الشتوي كبرقات كاملة. في هذا الوقت تفضل الفراشات النباتات الناضجة المتاحة حتى تضع البيض وفي نفس الوقت تعتبر هذه النباتات كمصائد. لسوء الحظ فان محاكاة الحاسب الآلي بانواع بخلاف هذه الحشرة O.nubilalis اظهر فشل هذه الاستراتيجية. لقد اتضح ان هذه الاستراتيجية غير ناجحة مع الانواع مثل دودة اللوز الامريكية H.virescens كما ذكر سابقا بسبب انها تتجنب النباتات المهندسة ببكتريا Bt عندما يكون لديها فرصة الاختيار بين النباتات ذات التوكسينات والاخرى الخالية منها (Frutos وآخرون ١٩٩٩).

الاصدارات الجارية عن ادارة التعامل مع مشكلة المقاومة:

الاصدارات الجارية المستخدمة حاليا: بعد الاستعراض الوافي من خلال الوثائق عن الموضوع الصادرة من وكالة حماية البيئة الامريكية EPA اتضح بجلاء ان استراتيجيات ادارة المقاومة تركز وتهتم بالنباتات المهندسة وراثيا ببكتريا Bt وليس مستحضرات الرش. لقد زاد الاهتمام بالموضوع اكثر بسبب الطبيعة الثابتة للتعرض للتوكسين الذي

تأخذ الحشرات من النباتات المهندسة وراثيا ببكتريا Bt والتي تنتج التوكسين خلال موسم النمو. بالإضافة الي ذلك فان جينات Bt علي عكس المستحضرات تطور وتنتج في معامل خاصة ومن ثم تعتبر جزء من اهتمام العامة وتحتاج لحماية اكثر (USEPA ١٩٩٩-أ). البرامج الجارية للإدارة الخاصة بالمقاومة تركز علي الاستراتيجية المشتركة جرعة عالية/ماوي والتي عادة تستخدم بالاشتراك مع تكديس الجين. في بعض الاحيان تستخدم استراتيجيات الموزايك او الدورات في المكان او كماوي. لقد نشرت EPA مقاييس جديدة قياسية للمحاصيل البكتيرية Bt مثل مونسانتو وديكالب. بالنسبة للذرة المهندس وراثيا Bt field corn في موسم النمو ٢٠٠٠ اوصت وكالة EPA ان تكون مساحة الماوي ٢٠ % من المساحات التي لا ينمو فيها القطن البكتيري Bt cotton. في المساحات التي ينمو فيها قطن الباسيلليس يكون من الضروري ترك ٥٠ % من المساحة كماوي. مساحة الماوي يجب الا تعامل باي مبيد حشري. هذا المطلب يمكن ان يعدل او يغير تحت حدود اقتصادية حرجة معينة. عند هذا الحد الحرج يكون مسموح للزراع باستخدام مبيد حشري غير بكتيري في اماكن ومساحات الماوي مما يؤدي الي استراتيجية الادارة اكثر قربا وشبيها بالموزايك. بالإضافة الي التشريعات الخاصة بحجم ومعاملة اماكن الماوي قامت الوكالة EPA بتوصيف مكان الماوي. اماكن الماوي الخارجية غير المعاملة يجب ان تكون في نطاق نصف ميل من حقل الباسيلليس Bt اما اماكن الماوي الخارجية المعاملة يجب ان تكون في نطاق ربع ميل من حقل ببكتريا الباسيلليس. قد يفضل المزارعون زراعة نباتات الماوي كشرائط strips داخل حقل الباسيلليس. يجب ترتيب الشرائط البكتيرية Bt مع الشرائط غير البكتيرية بالتبادل كل ٦ خطوط (اندرسون ١٩٩٩). القرارات الخاصة بوضع مكان الماوي او نباتات الماوي داخل الحقل او خارجة يمكن ان تتخذ بناء علي ما هو معروف عن عادات الحركة والانتقال وسلوك التزاوج للأنواع المستهدفة (EPA ١٩٩٩). بعض الاصناف الخاصة من الذرة المهندسة وراثيا ببكتريا Bt التي تنتج توكسين cryIAC لا يمكن زراعتها في المساحات التي ينمو فيها القطن البكتيري Bt الذي يستخدم نفس التوكسين. هذا بسبب بعض النواحي الخاصة عن تطور المقاومة في دودة كيزان الذرة وهي الآفة التي تستهدف كلا القطن والذرة واهيانا في نفس موسم النمو (EPA ١٩٩٩-ب). الذرة السكرية Bt لا تحتاج لمتطلبات تركيبية خاصة بالماوي حيث ان الحصاد المبكر لهذا المحصول يقلل من وجود اليرقات المقاومة في الحقول بشكل مؤثر (EPA ١٩٩٩-١).

علي نفس المنوال فان مزارعي البطاطس المهندسة وراثيا Bt يجب ان يزرعوا ٢٠ % من المساحة كماوي. كذلك ينصح الزراع بزراعة بطاطس Bt في حقول بعيدة بقدر الامكان عن المواقع السابقة لحقول البكتريا Bt. اماكن الماوي مع القطن البكتيري اقل تحفظا حيث ينصح بمساحة ماوي ٤% غير معاملة او ٢٠% مساحة ماوي تعامل. اذا كان المزارع يعيش داخل مساحة تمثل زراعات القطن البكتيري ٧٥% من اجمالي القطن يكون عليه زراعة الماوي في نطاق ميل حقول البكتريا Bt (US EPA ١٩٩٩ -). هناك جدل كبير حول هذه المتطلبات حيث ان القطن البكتيري يستهدف ثلاثة افات هي دودة براعم الدخان ودودة اللوز القرنفلية وديدان اللوز الامريكية. جرعة التوكسين التي تنتج بواسطة النبات تكون عالية بما فيه الكفاية تقتل كل حشرات ديدان براعم الدخان ودودة اللوز القرنفلي غير المتجانسة ولكن يكون مساوي لجرعة متوسطة في حالة ديدان اللوز الاخري. بدون حماية المقاومة عن طريق جرعة التوكسين العالية فان ديدان اللوز سوف تفقد حساسيتها سريعا لبكتريا Bt. العديد من التشريعات الواعدة لادارة هذه المشكلة خاصة مع القطن البكتيري مطلوبة.

بالاضافة لما ذكر اعلاه يلجأ بعض الفلاحين الي استراتيجيات الدورات rotation strategy ولكن هذا غير مشرع او مطلوب. الدورات يمكن ان تعتمد علي تبديل اصناف الهجين من نفس المحصول او زراعة محاصيل مختلفة مع بعضها (Benbrook ١٩٩٩). المحاصيل التبادلية مقبولة في الدمج مع الاستراتيجيات الاخري في تشريعات الوكالة EPA التي ذكرت قبلا ولكنها لا تعتبر كافية لوحدها. متطلبات الماوي اصبحت اكثر صرامة علي امتداد الوقت كلما تعلمنا شيئا حول تاثيرات الاستراتيجيات علي المستوي الكبير - بعيدا عن نماذج الحاسب الآلي ، المعامل ، القطع التجريبية الصغيرة حيث تم تصميم اماكن الماوي للمرة الاولى. الخطط المستقبلية تستهدف العمل في اتجاه مقاييس تقيد قياسية. ذلك ان الوكالة EPA تخطط لمواصفات اضافية لمزارعي البطاطس البكتيرية Bt والتحديد الكمي للمسافة التي يجب ان يبعدها الماوي من حقول التوكسين والمسافة التي يزرع عندها محصول البطاطس البكتيري في سنة ما بعيدا عن محصول البطاطس Bt من السنة السابقة. الخطط المستقبلية للوكالة EPA لمزارعي القطن تشمل ٦ -١٠% مساحات ماوي اكبر ولكن مساحة الماوي قد تظل تعامل بمبيدات حشرية غير بكتيرية مما يجعل هذه الاستراتيجية اكثر في اتجاه الموازيك.

اصدارات التعليم والمسايرة Education and compliance issues

أي استراتيجية لإدارة المقاومة يمكن ان تنجح اذا تم غرسها وتنفيذها بشكل مناسب. من غير الانصاف القول ان المزارعين يفهمون استراتيجيات المقاومة، ماذا توصي به او تمنعه وكالة حماية البيئة الامريكية EPA، وكيف تستطيعون تتبع والعمل مع هذه التكتيكات. استكشاف التطبيقات العملية والتعليم متروكة لمنتجي بكتريا Bt حيث ان الوكالة لا تملك المصادر لاستكشاف كل مزارعي النباتات المهندسة وراثيا ببكتريا Bt. بعد ذلك يقوم المنتجون بكتابة تقارير عن المواقبة او المسايرة للوكالة EPA. الاستخدام الخاطئ للماوي شاع كتابة او التشكيك فيه. بعض اماكن الماوي التي يقصد الا تعامل يتم رشها بالمبيدات الحشرية. نجاح الماوي يقوم بواسطة المزارعين الذين يزرعونها في اراضيهم الفقيرة ويعطونها عناية اقل عن النباتات الاخرى مما يجعلها اقل جذبا للحشرات (USEPA 1999 ب). زراعة المحاصيل البكتيرية حتي مع عدم الحاجة اليها تمثل مشكلة. الذرة البكتيري Bt كمثال يقدم الحماية ضد ثاقبة الذرة الاوربية. الاصابات الوبائية والفوران الشديد لتعداد الآفة هذه يحدث مرة واحدة كل خمسة سنوات بسبب صعوبة التنبؤ بميعاد حدوث الوباء فان بعض المزارعين يزرعون النباتات البكتيرية Bt كذلك وفي الغالب. بعض المزارعين اشاروا ان العوامل الوراثية المطلوبة في الذرة تتوفر فقط في الاصناف المهندسة بالباسيلليس Bt ومن ثم يقومون بزراعة النباتات الباسيلليس حتي لو لم تكن هناك ضرورة للتوكسين.

تعليم الفلاحين لا تحقق نجاحات في كل الحالات حيث من الضروري الحفاظ علي اماكن الماوي بصورة قياسية. بعض المزارعين اصدروا تقارير تفيد بانهم لم يتلقوا اية معلومات تتعلق بالحاجة للماوي او سبل زراعتها. البعض الاخر يحدث لديهم تشويش وتعارض بين متطلبات الزراعة من قبل منتجي Bt والتي تتطلب حرث السيقان القديمة واتباع ارشادات ودلائل الحفاظ علي التربة المحلية. من الواقع ان هذه الاقترابات تدعو الي الحاجة لتحسين الاتصالات بين الجهات المعنية. يجب تعليم الفلاحين كذلك عن كيفية استكشاف المحاصيل المزروعة لتحديد نجاح او فشل النباتات المهندسة وراثيا .

الاستنتاج وخلاصة القول: ما ذكر اعلاه يشير الي اهمية الاستراتيجيات الخاصة بإيقاف او مجابهة او التغلب علي او تفادي ظهور المقاومة لفعل وسائل المكافحة الحيوية خاصة الميكروبية بالياسيليس. الحق يقال انني قد استمعت وتعلمت كثيرا من هذا التناول لانها احتوت علي طرق واقترايات جديدة عقلانية تم عن فكر متفتح. لا غرابة في ان دراسة هذا واخري هناك اشارت الي جوانب الفشل التي تصاحب كل من هذه الاستراتيجيات. لم تسلم أي دراسة من القول بان الظروف الحقلية وما يحدث فيها غير ممكن التنبؤ به كما لا توجد معلومات كافية عن سلوك الآفات بما يؤكد تواكبها مع النماذج التي نحن بصددھا. لقد اجريت بحوث كثيرة في اتجاه وراثية المقاومة وسلوك الآفة في النظام البيئي وتكرارية الليلات المقاومة في المجاميع الطبيعية والمقاومة المشتركة للتوكسين وحتى التأثيرات الاقتصادية لهذه الاستراتيجيات. مع هذا فما زالت المعلومات المتوفرة لا تقدم ضمانات كافية او حتي امكانيات نجاحات التنبؤ بما سوف يحدث في الحقل. في هذا المفهوم فانه لا احد في الاستراتيجيات الموضوعية وحتى المستخدمة فعلا لقت القبول الكامل اذا كنا معنيين حقا بالحفاظ علي بكتريا Bt كوسيلة امنة وفعالة في مكافحة الحشرات.

مشكلة المحاصيل المهندسة وراثيا ببكتريا Bt:

يمكن استعراض العديد من الفوائد والمميزات من جراء استخدام النباتات المهندسة وراثيا. اول الفوائد تقليل العمالة وما يتبعها من تكاليف والتزامات صحية واجتماعية ومادية لان المستحضر البكتيري ليس في حاجة لتكرار الاستخدام مرات عديدة خلال الموسم. كذلك يقل كثيرا تأثيرات الظروف الجوية علي المبيد كما ان الاجراء النباتية التي لا يمكن الوصول اليها بالرش علي المجموع الخضري كما هو الحال في داخل السيقان النباتية سوف تغطي بالمبيد. من اكثر الفوائد التي تثير الاهتمام: تغطية كل النبات كما ان التوكسين ينتج في الموسم المطلوب فقط (Monsanto 2000). اذا تكونت المقاومة فلا تكون هناك فوائد ولا مميزات بل العكس هو الصحيح تماما. كما تاكد من متطلبات استمرار زراعة نباتات الماوي يصبح من الصعوبة البالغة تعويض التلف والضرر الذي يحدث في فاعلية التوكسين من جراء استمرار تعرض الآفات والبيئات التي تعيش فيها للتوكسين. بالاضافة الي ذلك فان هناك نقطة عندها لا يمكن للمزارعين قبول الفقد والخسارة في الانتاجية المحصولية التي تنتج من زراعة نباتات ومسااحات الماوي. إيقاف الفقد المحصولي من جراء السماح بمعاملة نباتات الماوي بالمبيد ليست هي الاجابة عن هذا التساؤل لانها توقف او تنقص فقط من المجموع المتاح من الحشرات الحساسة لبكتريا Bt. الاستراتيجية الحكيمة او الاكثر حكمة لادارة المقاومة ليست مجرد محاولات لتقديم

حشرات حساسة والتي قد تختار أو لا تختار التزاوج مع الحشرات المقاومة ولكن خفض تعرض كل الحشرات للتوكسين لتقليل الضغط الانتخاوي بقدر الامكان مع استمرار المحافظة على وسيلة مكافحة الآفات فعالة.

المنتجات الجارية الان المهندسة وراثيا بكتريا Bt لا يبدو انها تمثل جزء من الحل لمشكلة ادارة التامل مع ظاهرة المقاومة. هناك حلين متاحين يتضمننا وجود توكسينات Bt عند الحاجة فقط. احد الحلول تتضمن الهندسة الوراثية المتقدمة للنباتات والاخرى يتضمن هندسة وراثية اقل للنباتات. احد الحلول يتمثل في التعبير عن وقت معين time-specific expression. كما ذكر اعلاه عن هذه الطريقة فانه لا توجد طريقة في الوقت الراهن تستطيع التعبير بالتوكسين في وقت محدد ومعين. افضل توقيت للتعبير عن التوكسين سوف يكون في الانسجة التالفة او المعرضة للضرر فقط. النباتات الغير مضارة بالآفات سوف لا تنتج توكسينات. التعرض للتوكسين سوف يحدث فقط عندما يكون ضروريا. الحل الاخر يتمثل في استخدام الباسيلليس Bt كرش للمجموع الخضري فقط. فوائد النباتات المهندسة وراثيا بالباسيلليس ليست كافية لاحداث تعرض زائد للتوكسين. بكتريا Bt تكون فعالة فقط عندما تستخدم بالشكل المناسب في الرش. بسبب التخصص الشديد للباسيلليس فانها ليست في حاجة للافراط في الاستخدام وفي الحقيقة فانها تكون افضل اذا لم تستخدم النباتات المهندسة وراثيا بما يقلل او يوقف العمالة. المزارعين عليهم ان يستخدموا التوكسين فقط عند حدوث او يكون هناك احتمالات كبيرة لحدوث اصابات وبائية وتلف كبير اقتصادي من الآفات المستهدفة وكذلك في المساحات التي يحدث فيها الضرر فقط. لقد نجح زراع الزراعة العضوية وهؤلاء الذين يزرعون في المساحات الصغيرة باستخدام هذه الطريقة لسنوات.

المستقبل The Future:

البحوث المستقبلية سوف تركز على سد الفجوة المعلوماتية كما ذكر سابقا خاصة ما يتعلق بسلوك الآفة وخصائص مقاومة الحشرة التي لم نفهمها حتي الان. هذا سوف يؤدي الي برامج مجابهة المقاومة اكثر عقلانية. يجب اخذ وتوخي الحرص والعناية بجعل الفلاحين والمزارعين علي دراية كاملة بتفاصيل برامج المقاومة هذه وماذا يفعلون حتي يتأكدوا من ان زراعتهم تتوافق مع هذه البرامج. يجب ان تستمر البحوث في اتجاه التعبير بالتوكسين في وقت او اوقات معينة. الدمج مع البحوث الخاصة بالسلوك والمقاومة في الحشرة سوف يساعد في اتخاذ القوار ما اذا كان التعبير الزمني اسلوب ناجح لابقاف المقاومة. بسبب عدم وجود طرق حتي الان للتعبير عن Bt فقط عندما يحدث ضرر

للانسجة فأننا مازلنا في حاجة لمزيد من الدراسات والبحوث في هذا الاتجاه. ان فهم ما هية الباسيلليس ثورينجنسيز يساعد في محاولات ايجاد اكثر من نوع من البكتريا التي يكون لها نفس الاستخدامات في الزراعة. هناك بكتريا اخري في التربة تماثل خصائص الباسيلليس Bt في الصفات الابادية للحشرات. ان الكشف عن بكتريا اكثر ذات فعالية وامان علي غرار Bt او الكشف عن فرق لغرس وادخال البكتريا المتاحة الان كمبيد فعال سوف تكون من حسن الطالع وتاكيد للامان في المستقبل وتامين هذا المستقبل عندما تتطور المقاومة لبكتريا Bt.

خلاصة القول ان التكنولوجيا الحيوية يمكن ان تستخدم لصالحنا او ضدنا في برامج ادارة المقاومة. البحوث المستقبلية سوف توضح لنا أي طريق نسلك في نفس الوقت يجب ان تكون وكالة حماية البيئة الامريكية EPA ومنتجي بكتريا الباسيلليس Bt والمزارعين متحفظين ومتوخي الحذر في خلق وتعصيد والتواكب مع الاستراتيجيات الجارية عن المقاومة. بكتريا Bt تعتبر مبيد نموذجي وسوف يؤدي فقده الي ماساء كبيرة تدخل في نطاق سوء الحظ.

References

- Alstad, D. N. and Andow, D. A. 1995. Managing the evolution of insect resistance to transgenic plants. *Science* 268: 1894-1896.
- Anderson, J. L. 1999. Letter to Bt corn registrant. Available at: <http://www.epa.gov/opppbpd/pesticides/otherdocst.com.ltr.htm>
- Baum, J. A., Johnson, T. B., and Carlton, B. C. 1999. *Bacillus thuringiensis*: Natural and recombinant bioinsecticide products. In: *Biopesticides: Use and Delivery*, Hall, F. R. and Menn, J. J., Eds., Humana Press, Totowa, NJ, 189-210.
- Benbrook, C. 1999. EPA 's plant pesticide refuge program: Questions from the Chicago workshop. Available at: <http://www.biotech-info.net/meeting/report.html>.
- Caprio, M. A. 1998. Evaluating resistance management strategies for multiple toxins in the presence of external refuges. *J. Econ. Entomol.* 91: 1021-1031.
- Chilcutt, C. F. and Tabashnik, B. E. 1997. Independent and combined effects of *Bacillus thuringiensis* and the parasitoid *Cotesia plutellae* (Hymenoptera: Braconidae) on susceptible and resistant diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *J. Econ. Entomol.* 90: 397-403.
- Comins, H. N. 1977. The development of insecticide resistance in the presence of migration. *J. Theor. Biol.* 64: 177-197.
- Croft, B. A. 1990. Developing a philosophy and program of pesticide resistance management. In: *Pesticide Resistance in Arthropods*, Roush, R. T. and Tabashnik, B. E., Eds., Chapman and Hall, New York, NY, 277-296.
- Curtis, C. F. 1981. Possible methods of inhibiting or reversing the evolution of insecticide resistance in mosquitoes. *Pestic. Sci.* 12: 557-64.

- Ely, S. 1993. The engineering of plants to express *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. In: *Bacillus thuringiensis, An Experimental Biopesticide: Theory and Practice*, Entwistle, P. F., Cory, J. S., Bailey, M. J., and Higgs, S., Eds., John Wiley & Sons, Chichester, UK, 105-124.
- Frutos, R., Rang, C., and Royer, M. 1999. Managing insect resistance to plants producing *Bacillus thuringiensis* toxins. *Critical Reviews in Biotechnology* 19: 227-276.
- Gould, F. 1998. Evolutionary biology and genetically engineered crops. *BioScience* 38: 26-33.
- Ciould, F., Anderson, A., Jones, A., Sumerford, D., Heckel, D. G., Lopez, J., Micinski, S., Leonard, R., and Laster, M. 1997. Initial frequency of alleles for resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in field populations of *Heliothis virescens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 3519-23.
- Gould, J. L. and Keeton, W. T. 1996. *Biological Science* (6th Ed.) New York: W. W. Norton and Company.
- Hone, H. and Whiteley, H. R. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* 53: 242-255.
- Hoy, M. A. 1998. Myths, models and mitigation of resistance to pesticides. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 353: 1787-95.
- Huang, F., Buschman, L. L., Higgins, R. A., and McGaughey, W. H. 1999. Inheritance of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin (Dipel ES) in the European corn borer. *Science* 284: 965-967.
- Iqbal, M., Verkerk, R. H. J., Furlong, M. J., Ong, P. C., Rahman, S. A., and Wright, D. J. 1996. Evidence for resistance to *Bacillus thuringiensis* (Bt) subsp. *kurstaki* HD-1, Bt subsp. *aizawai* and Abamectin in field populations of *Plutella xylostella* from Malaysia. *Pestic. Sci.* 48: 89-97.
- Kegley, S.E. and Wise, L.J. 1998. *Pesticides in fruit and vegetables*. Sausalito, CA: University Science Books
- Kota, M., H. Daniell, S. Varma, S. F. Garczynski, F. Gould, and W. F. Moar. 1999. Overexpression of the *Bacillus thuringiensis* (Bt) Cry2Aa2 protein in chloroplasts confers resistance to plants against susceptible and Bt-resistant insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 1840-5.
- Lereclus, D., Delecluse, A., and Lecadet, M.-M. 1993. Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes, in: *Bacillus thuringiensis, An Environmental Biopesticide: Theory and Practice*, Entwistle, P. F., Cory, J. S., Bailey, M. J., and Higgs, S., Eds., John Wiley & Sons, Chichester, UK, 37-69.
- Liu, Y. B. and Tabashnik, B. E. 1997. Experimental evidence that refuges delay insect adaptation to *Bacillus thuringiensis*. *Proc. R. Soc. Lond B* 264:605-10.
- Liu, Y. B., Tabashnik, B. E., Dennehy, T. J., Patin, A. L., and Bartlett, A. C. 1999. Development time and resistance to Bt crops. *Nature* 400:519.

- Mallet, J. and P. Porter. 1992. Preventing insect adaptation to insect-resistant crops: are seed mixtures or refugia the best strategy? *Proc. R. Soc. Lond. B* 250: 165-9.
- Macintosh, S. C., Stone, T. B., Jokerst, R. S., and Fuchs, R. L. 1991. Binding of *Bacillus thuringiensis* proteins to a laboratory-selected line of *Heliothis virescens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 8930-8933.
- Man-one, P. G. and Macintosh, S. C. 1993. Resistance to *Bacillus thuringiensis* and Resistance Management, in: *Bacillus thuringiensis. An Environmental Biopesticide: Theory and Practice*, Entwistle, P. F., Cory, J. S., Bailey, M. J., and Higgs, S., Eds., John Wiley & Sons, Chichester, UK, 221-235.
- McGaughey, W. H. 1985. Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Science* 229: 193-195.
- McGaughey, W. H., Gould, F., and Gelemter, W. 1998. Bt resistance management. *Nat. Biotech.* 16: 144-6.
- Michaud, D. 1997. Avoiding protease-mediated resistance in herbivorous pests. *Trends Biotech.* 15: 4-6.
- Miller, G.T. 1998. *Living in the environment* (10th ed.). Belmont, CA: Wadsworth
- Monsanto. 2000. The whole plant. The whole season. Available at:
http://www.monsanto.com/monsanto/agriculture/current_products/yieldgard_ipco_m/whole_plant_season.html.
- Oppert, B., Kramer, K. J., Beeman, R. W., Johnson, D., and McGaughey, W. H. 1997. Proteinase-mediated insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *J. Biol. Chem.* 272: 23473-23476.
- Pimentel, D., and Burgess, M. 1985. Effects of Single Versus Combinations of Insecticides on the Development of Resistance. *Environ. Entomol.* 14: 582-9.
- Tabashnik, B. E. 1994a. Delaying insect adaptation to transgenic plants: seed mixtures and refugia reconsidered. *Proc. R. Soc. Lond. B* 255: 7-12.
- Tabashnik, B. E. 1994b. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu. Rev. Entomol.* 39: 47-79.
- Tabashnik, B. E. 1997. Seeking the root of insect resistance to transgenic plants. *Proc. Natl. Sci. USA* 94: 3488-3490.
- Tabashnik, B. E., Liu, Y.-B., Finson, N., Masson, L., and Heckel, D. G. 1997. One gene in diamondback moth confers resistance to four *Bacillus thuringiensis* toxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 1640-1644.
- Tabashnik, B. E., R. T. Roush, E. D. Earle, and A. M. Shelton. 2000. Resistance to Bt toxins. *Science* 287: 42.
- Tabashnik, B. E., Finson, N., Groeters, F. R., Moar, W. J., Johnson, M. W., Luo, K., and Adang, M. J. 1994. Reversal of resistance to *Bacillus thuringiensis* in *Plutella xylostella*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 4120-4.
- Tabashnik, B. E., Liu, Y.-B., Malvar, T., Heckel, D. G., Masson, L., Ballester, V., Granero, F., Mensua, J. L., and Ferre, J. 1997. Global variation in the genetic and biochemical basis of diamondback moth resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 12780-12785.

United States Environmental Protection Agency. 1999a. EPA and USDA position paper on insect resistance management in Bt crops. Available at:

http://www.epa.gov/oppbppdl/biopesticides/otherdocs/bt_position_paper_618.htm

United States Environmental Protection Agency. 1999b. Meeting summary: EPA-USDA Bt crop insect resistance management workshop. Available at:

<http://www.epa.gov/oppbppdl/biopesticides/summary826.htm>.

Van Frankenhuyzen, K. 1993. The challenge of *Bacillus thuringiensis*. *Bacillus thuringiensis*, An Environmental Biopesticide: Theory and Practice, Entwistle, P. E., Cory, J. S., Bailey, M. J., and Higgs, S., Eds., John Wiley & Sons, Chichester, UK, 1-35.

Van Rie, J., McGaughey, W. H., Johnson, D. E., Barnett, B. D., and van Mellaert, H. 1990. Mechanism of insect resistance to the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Science* 247: 72-74.

Van Rie, J., Van Mellaert, H., and Peferoen, M. 1992. Mechanism of insect resistance to *Bacillus thuringiensis* in *Plodia interpunctella* and *Plutella xylostella*. In: *Molecular mechanisms of insecticide resistance: diversity among insects*, Mullin, C. A. and Scott, J. G., Eds., American Chemical Society, Washington, DC.

Wearing, C. H. and Hokkanen, H. M. T. 1995. Pest resistance to *Bacillus thuringiensis*: ecological crop assessment for Bt gene incorporation and strategies of management, in: *Biological control: benefits and risks*, Hokkanen, H. M. T. and Lynch, J. M., Eds., Cambridge University Press, Cambridge, UK, 236-252.

Whalon, M. E. and W. H. McGaughey. 1998. *Bacillus thuringiensis*: Use and Resistance management. In: *Insecticides with novel modes of action: mechanism and application*, Ishaaya, I. and Degheele, D., Eds., Springer, Berlin, 106-137.

Wirth, M. C., Georgiou, G. P., and Federici, B. A. 1997. CytA enables CryIV endotoxins of *Bacillus thuringiensis* to overcome high levels of CryIV resistance in the mosquito, *Culex quinquefasciatus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 10536-40.

اقوال ماثورة عن ادارة مقاومة الآفات : دراسة حالة عن البطاطس - Bt

• هل يمكنك تخيل نبات ينتج بروتينه الذاتي القاتل للحشرات مع تخصص عالي وامان بيئي متميز؟

• هل يمكنك تخيل ان هذا البروتين الغذائي الامن قد تحصل عليه في الاصل من بكتريا شائعة في التربة وليس من النبات؟

هذا ليس خيال علمي ولكنه حقيقة علمية مؤكدة.....

في ابريل ١٩٩٥ قامت وكالة حماية البيئة الامريكية EPA بتسجيل ثلاثة مبيدات نباتية من جراء الهندسة الوراثية للنباتات بما يجعلها قادرة علي انتاج بروتين الاندوتوكسين لبكتريا التربة باسيلليس ثورينجنسيز (Bt). لقد كانت نباتات البطاطس والذرة والقطن والطماطم من اول النباتات المنتجة للمبيدات التي طورت من خلال وسائل التكنولوجيا الحيوية وتم تسجيلها من قبل الوكالة طبقا للتشريعات في هذا الشأن. الذرة السكرية البكتيري Bt في الطريق الي التسويق التجاري. في عام ١٩٩٧ تم زراعة حوالي ٤٠,٠٠٠ اكر من البطاطس المنتجة لاندوتوكسين الباسيلليس Bt بهدف الانتاج التجاري. لقد كانت الآفة المستهدفة خنفساء كلورادو البطاطس وهي من اخطر افات هذا المحصول الهام. لقد كان المستهدف زراعة من ٥٠ وحتى ١٠٠ الف اكر بحلول ١٩٩٨. بالاضافة الي البطاطس كان متوقعا ان تصل مساحة القطن البكتيري Bt الي ٢ مليون اكر والذرة البكتيري Bt الي مليون اكر في عام ١٩٩٨. لقد توقع الكثيرون وتنبأوا بان استخدام النباتات المهندسة وراثيا ببكتريا Bt سوف تقل بشكل كبير ومعنوي من استخدام المبيدات المخلقة علي هذه المحاصيل الاقتصادية. مع هذا ظلت هذه الاستراتيجية محل نقاش وجدل كبيرين بسبب العديد من المشاكل والاعتبارات التي لم يمكن حلها او الاتفاق عليها خاصة وما يقال من ان التوسع في استخدام النباتات البكتيرية Bt سوف يزيد ويحفز من تطور عدم الحساسية لوسيلة المكافحة بين الآفات الحشرية المستهدفة. هذه مخاوف في محلها ارجو توضيحها فيما بعد.....

العلم يزودنا بالدليل عن معدلات المقاومة في الآفات

حديثا اظهرت تقارير تقويم المخاطر الاحتمالات الكبيرة عن مقدرة الحشرات لتكوين مقاومة سريعة من جراء التكيف والتعود علي توكسينات بكتريا Bt. لقد وجد ان اعداد كبيرة من الحشرات في المجاميع المدروسة تملك مقاومة وراثية للباسيلليس. مع

التعرض المستمر لمستويات عالية من توكسين البروتين في النباتات البكتيرية Bt فان صور المقاومة سوف تستمر في البقاء ويحدث فيها تهجين بيني. هذا التهجين الداخلي او البيئي سوف يزيد ويرفع من مقاومة الآفة للصور المتاحة من بكتريا Bt ومن خلال المقاومة المشتركة قد تمتد العملية الى صور اخري من بكتريا Bt لم تطلق بعد. لقد وجد ان آفة براعم الدخان (*Heliothis Virescens*) ذات مقاومة وراثية في واحد من مجموع ٣٥٠ فرد تم جمعها من حقول القطن. هذا المردود يوضح مقاومة عالية بعيدة كثيرا عما تتبأ به البحوث مبكرا من خلال النماذج النظرية. لقد تتبأ الخبراء بحدوث دورة دوام مدتها ٣-٤ سنوات للنباتات البكتيرية Bt المزروعة حتي مع طرق ووسائل ادارة التعامل مع المقاومة الجارية حاليا.

ادارة مقاومة الآفات Pest Resistance Management

الاستراتيجيات لتحقيق الحصول علي نباتات تتحمل او تقاوم مبيدات الحشائش او الآفات الحشرية والممرضات مثل الفيروسات والبكتريا والفطريات والنيما تودا والنباتات الطفيلية من خلال التكنولوجيا الحيوية لاقت اهتمام متزايد بسبب كفاءتها العالية في خلق عدم حساسية للآفات. عدم الحساسية هذا او المقاومة المكتسبة تاكد وسجل وثائقيا مع كل مثل المبيدات الحشرية الكيميائية وصفات المقاومة النباتية والتي تنتج من عامل وراثي فردي سائد. لقد تم تطوير استراتيجيات جديدة للحفاظ وصيانة مجموع الآفة بحيث تستمر حساسية لوسيلة مكافحة. هذا عنصر ضروري جدا في غرس هذه التكنولوجيات الجديدة وادخال هذه المنتجات للحفاظ او بما يحافظ علي فعاليتها علي امتداد سنوات عديدة. بالنسبة للمحاصيل المنتجة لبكتريا Bt تتضمن استراتيجيات مقاومة الآفة النواحي التالية:

١- انتاج عالي لبروتين التوكسين في النبات لقتل الآفات الحساسة جميعا والنادرة من غير الحساسية.

٢- ملاذات النباتات الخالية من بكتريا Bt والتي تسمى المأوي refugia لصيانة تربية وتكاثر المجموع الحساس لبكتريا Bt من الآفة. هذا المجموع سوف يزيد في العدد عن الافراد غير الحساسة ومن خلال التزاوج سوف يمنع بشكل فعال تطور وزيادة مجموع الافراد ذات المقاومة العالية.

"قبل مناقشة مميزات هذا النظام من إدارة المقاومة بالتفصيل سوف نسترجع بعض الحقائق والأساسيات عن المبيدات الحشرية البكتيرية Bt"

ما هو توكسين بكتريا الباسيليس What is Bt-toxin؟

توكسين - Bt من منتجات ادارة مكافحة الآفات المعروفة جيدا للمزارعين ورجال البساتين خاصة مسئولى الحدائق المنزلية بداية لمكافحة الآفات الحشرية من رتبة حرشفية الاجنحة مثل قافزات الكرنب ودودة ثمار الطماطم. العديد من صور Bt - توكسين تم تسجيلها من قبل وكالة حماية البيئة الامريكية EPA لمكافحة انواع عديدة من الآفات الحشرية. هذه المنتجات الحديثة للتهجين المبني على التكنولوجيا الحيوية كما ذكر قبل كانت محورة وراثيا لانتاج البروتين البلوري لبكتريا Bt القاتل للحشرات والذي يستخدم عادة على النباتات في صورة مسحوق محبب خلال مرحلة النمو العادي للنباتات. لقد استخدمت مستحضرات البكتيريا Bt بشكل فعال في حقول انتاج الخضراوات بما فيها حقول الزراعة العضوية لما يزيد عن ٤٠ عاما. المبيدات الحشرية التي تعتمد على Bt معروفة جيدا من منظور الامان البيئي وعدم وجود اية تأثيرات سامة على الثدييات. تنشيط التوكسين يتطلب ظروف قلبية توجد في معدة الحشرة عما هو الحال مع الظروف الحامضية الموجودة في السوائل المعدية في الثدييات. بالاضافة الى ذلك فان توكسين - Bt يتكسر بسرعة في البيئة ويتحول الى مركبات غير سامة. هذا التدهور السريع بواسطة الاشعة فوق البنفسجية UV كمثال حدث من الثبات والفاعلية لمحول رش البكتريا Bt. تحقيق ثبات توكسين - Bt بانتاجه داخل خلايا النباتات يعتبر من احد الفوائد لهذه الاصناف النباتية الجديدة المهندسة وراثيا.

الان توجد اصناف بطاطس متاحة على المستوى التجاري تنتج في خطوط الانتاج Newleaf TM من شركة Nature Mark وهو قسم من مؤسسة Monsanto crop. واسماء هذه الاصناف اتلانتك، سوبيريور، راسيت بيرنيك وهي قادرة على انتاج بروتين توكسين الباسيليس Bt وراثيا. هذه الاصناف المنتجة للمبيد الحشري داخلها تهيئ امنة بوجة عام وكذلك ذات فاعلية عالية ومتوافقة بيئيا. الفاعلية طويلة المدى للنباتات المهندسة او المحورة وراثيا للحماية ضد العديد من الآفات الضارة مثل خنفساء كلورادو البطاطس سوف تعتمد على العناية والحذر في برامج الادارة للمقاومة في الآفات تجاه هذه الوسائل الفعالة والتنمية. ان الكفاءة نحو التطور السريع لعلم الحساسية تجاه مستحضرات الرش لمكافحة الآفة او النباتات التي تنتج المبيد الحشري تكدت بشكل عريض من عاقلة كبيرة من بروتينات Bt ومبيدات الحشائش واستراتيجيات التعامل وادارة المقاومة للفيوسات

وغيرها من الكيمياءات والعوامل الوراثة. لقد اتفق الخبراء علي ضرورة توفير معلومات اكثر عن استراتيجيات ادارة المقاومة لحماية الانجازات التي تحققت مع البطاطس المنتجة لتوكسين بكتريا Bt وكذلك المستحضرات التقليدية للباسبيليس التي تستخدم رشا علي النباتات. مع منع تطور المقاومة بواسطة الآفات للبروتينات التي تنتج داخل النباتات سوف تستمر مكافحة الفعالة بهذه الوسائل لسنوات عديدة قادمة.

لماذا لاقت البطاطس المهندسة وراثيا ببكتريا Bt مزيد من الاهتمام؟

الوسا للتكنولوجيا الحيوية تستخدم لادخال صفة مسولة عن مكافحة الآفة او صفة تحقق تحمل النبات لفعل المادة الكيميائية (كما هو الحال مع مبيدات الحشائش) في النباتات. لقد اجري هذا الاقتراب علي امل تقليل استخدام الرش بالمبيدات الحشرية المخلقة. كبداية فإن الفائدة المشتركة تتمثل في ادخال مواد معتدلة او صديقة للبيئة او مواد تستخدم بجرعات متناهية في الصغر لنحل محل المركبات الحالية التي تواجد الكثير من الاعتراضات والانتقادات. لقد تزايد الاهتمام عما اذا كانت هذه الاستراتيجيات وحيدة الجين والتي هي متاحة في الاسواق علي نطاق تجاري في الوقت الراهن سوف تسبب ان مزيد من الآفات سوف يصبح غير حساس لكلا النبات المقاوم للآفة ولمستحضرات الرش الموجودة الصديقة للبيئة مثل بروتين Bt. المقاومة قد تحدث سريعا بشكل نسبي في الغالب بسبب ان جزء من الآفات في أي مجموع حقلي غير حساس طبيعيا لبعض الكيمياءات والنباتات التي تعتمد علي عوامل وراثية للمقاومة. كذلك فإن المقاومة لمادة ما قد تعطي الآفة تحمل للمركبات المرتبطة وهذا يطلق علي المقاومة المشتركة cross-resistance. هذه الصور غير الحساسة للآفة ذات ميزة في البقاء والنمو والتكاثر مع الاستخدام المتكرر للمبيد او زراعة الصنف النباتي المقاوم وراثيا. المجموع غير الحساس يزداد كلما زادت صفات المقاومة (عوامل المقاومة للمبيد الكيميائي او النباتات المقاومة) حتي تصبح مكونة لغالبية المجموع من خلال التربية الاكثر تكرارية. الحشرات غير الحساسة لبكتريا Bt والتي تنتخب من خلال الاستخدام الخاطئ للنباتات المحتوية علي Bt سوف يقلل من قيمة وسيلة ادارة مجابة الآفة بالنسبة لمستخدمي التكنولوجيا وغير مستخدميها.

ماذا يعني ادارة المقاومة في الآفات؟

التطبيقات المتكررة لمبيد مفرد (او نبات به صفة مقاومة الآفة) ذات مقدرة في زيادة وفرة الآفات غير الحساسة للمنتجات التي قدمت حديثا للرش او للاصناف النباتية

المقاومة للأفة . مشكلة المقاومة للمبيد في الزراعة التقليدية تعتبر من أخطر الأمور وقد قدر انه ينفق عليها ٢٥% من كل ما ينفق في أمريكا سنويا لمكافحة الآفات . علي عكس ما ذكر قبلا في اتجاه قتل الآفات الزراعية فانه قد طورت برامج للحصول علي ملاذات نباتية plant sanctuaries يطلق عليها refugia لصيانة مجاميع افات المحاصيل الحساسة للمبيدات. التحدي والتوقع من صناعة التكنولوجيا الحيوية تتمثل في الاقتراب الناشئ من دفع السوق لتقليل الآفات المستهدفة لحد حيث تصان ويحافظ علي الفوائد عن طريق تكامل المنتجات في نظام بيئي زراعي مدار جيدا. المأوي والاستخدام الموسمي المتبادل للمحاصيل المحورة وراثيا تعتبر المكونات الرئيسية لهذه الاستراتيجية. في غياب خطة مكثفة لإدارة المقاومة يزداد قبول النشر العريض لبكتريا الباسيلليس المقاومة (عدم حساسية الآفات الحشرية لتوكسين بروتين Bt) خلال اقل من ٥ سنوات. التجانس المحصولي في مساحات كبيرة من العوامل المطلوبة لمجموع الصور غير الحساسة للأفة بما يجعلها تزداد عند هذا المعدل من التنبؤ. افضل الطرق لمنع انتخاب المجاميع غير الحساسة من الأفة تبقى محل جدل وما يصابها من بيانات محدودة صالحة من الحقل. كما هو الحال مع أي تكنولوجيا جديدة فانه لا يحقق الفوائد من الاستخدام لفترات طويلة من الزمن مما يستدعي اخذ الاحتياطات. يستحب ان يكون هناك اقتراب اقليمي للإدارة الفعالة لمقاومة الآفات . هذا التوجه يجري في صور علمية مفتوحة من قبل الخاصة والعامه. الاشتراك في هذا التوجه بواسطة رجال البيئة ومجموعات الحفاظ علي المصادر الزراعية والعامه ذات تاثير قوي علي التطور التجاري وتسجيل وتسويق النباتات الجديدة التي تنتج بروتين - Bt وبرامج إدارة المقاومة. النقطة الاساسية المحدودة تتمثل في إدارة المعدل الذي عنده تصبح الآفات مقاومة للمبيد او وسائل المقاومة الكيميائية او الوسائل الحيوية او المقاومة الوراثية من تربية النباتات التقليدية او مقاومة الأفة من خلال التحوير الوراثي علي المستوي الجزئي مما جعل من هذا الاقتراب موضوع زراعي حرج.

ما هي النواحي المحددة الفاتحة في إدارة المقاومة في الآفات؟

الاهتمامات عظيمة واكثر الحاحا بالنباتات المحورة من خلال التكنولوجيا الحيوية بحيث تسوق وبها مبيدات تقتل الحشرات او تقاوم الفيروسات او بها صفات تحقق تحمل مبيد الحشائش. الاصدارات الفاتحة تتمثل في النواحي التالية:

- المقاومة المشتركة cross-resistance: المقاومة لمركب ما يحدث مقاومة في المركبات المرتبطة به.

- التربية المشتركة cross-breeding لعوامل المقاومة للنباتات المستوطنة خاصة في مراكز الاصول الوراثية او مراكز الاصول النباتية.
- احتمال زيادة استخدام المبيدات الكيميائية واسعة الانتشار والتي سوفت بالاشتراك مع المحاصيل المطورة بالتكنولوجيا الحيوية.
- اكتساب الصفات الجديدة بواسطة الممرضات التي تكسر المقاومة النباتية الوراثية او التي تحقق عنفوانية جديدة (aggressiveness) او المدي العوائلي.
- مع البطاطس البكتيرية - Bt فان احتمال التربية المشتركة للنباتات المتوطنة تعتبر غير واردة بشكل كبير. نوعين من البطاطس المحلي القريبة التي لا تكون درنات والقريبة للنوع الاصلي سولانوم تيبوروزم وجدت في امريكا. يوجد سولانوم فينولييري ، سولانوم جاميسي. العزل الجغرافي لهذه الانواع القريبة من حقول انتاج البطاطس والعزل اللاحق المتقدم بسبب حواجز التربية ذات الظروف والعوامل الوراثية المشتركة من ضمن المعايير التي تستخدم بواسطة وكالة حماية البيئة الامريكية EPA بما يسمح بتسجيل النباتات المنتجة للباسبيليس.

من يشرع التعامل مع البطاطس البكتيرية - Bt ويعضد ادارة مقاومة الافات؟

الشركات التجارية وراء البحوث الاكاديمية والمنظمات البيئية والوكالات المحلية والفيدرالية للتشريع تعمل معا لتطوير افضل استراتيجيات للادارة تحافظ علي كفاءة المنتجات الموجودة والجديدة المستخدمة في مكافحة الافات. استجابة لبعض الجزئيات في اتجاه التطوير السريع التجاري للنباتات المقاومة للحشرات من خلال التربية الجزيئية (الهندسة الوراثية) كونت وكالة حماية البيئة الامريكية EPA مجموعة عمل لادارة مقاومة الافات (PRMW) في عام ١٩٨٨. لجنة الخبراء تكونت من ممثلي امراض النباتات، الميكروبيولوجيا، الحشرات، علوم الحشائش، ايكولوجيا النظم، الكيمياء الحيوية. لقد قامت هذه اللجنة بوضع الدلائل العامة ومعايير ادارة المقاومة والخطط اللازمة التي يجب ان تشمل:

١. معلومات عن بيولوجية وايكولوجية الافة.
٢. استراتيجيات فعالة للحفاظ علي المصادر الوراثية للمقاومة.
٣. توصيات الماوي الفعال (الماوي يجب وبالضرورة ان يكون ملاذ لمجموع الافة الحساسة).

٤. استكشاف تطور المقاومة وتسجيلها في تقارير ومتابعة خطة إيقافها.
 ٥. ادخال وغرس وتنفيذ استراتيجيات الادارة المتكاملة للآفات (IPM) في التوصيات.
 ٦. برامج الاتصال والتعليم عن استخدامات المنتج المسئول.
 ٧. السعهد بتطوير كيميائيات بديلة او أنشطة والاستراتيجيات الوراثة التي تؤخر او تمنع تطور المقاومة للآفة.
- الاستراتيجيات التي تعتمد علي المحصول والآفة تمثل افضل الاقترابات الجارية والمعروفة والعملية للحفاظ علي دوام المبيدات المبنية علي بكتريا Bt لكل واحد. تخفيض بعض عناصر الخطة تبقي لحد كبير بدون اجابة حتي تتولد خبرات من جراء الاستخدام الواقعي وتشمل:
- تصميم وادارة المأوي (النظام المناسب ، النسبة مع المحصول البكتيري Bt ، خاصة مسافات وضع وتنفيذ حقل المأوي من المحصول البكتيري - Bt... للاسف الشديد غير مفهومة. لقد ادت اراء الخبراء الي الاقتراح بان علي الاقل ٢٥% من النباتات غير البكتيرية في نظام الشرائح يجب ان يتبع ولكن الوضع الجاري يمثل اقل قليلا من ٤% مأوي).
 - معدلات مقاومة المبيد - انتخاب الجين بين الآفات تحت الظروف الحقلية.
 - التباين في مستويات انتاج بروتين الباسيلليس - Bt تحت ظروف الاجهاد الحقلية (استراتيجيات الجرعة العالية لقتل الكل ولكن معظم الافراد المقاومة ، يعتقد انها مطلوبة لادارة الفعالة لمقاومة الآفات. البطاطس البكتيرية ثم هندستها وراثيا لتحقيق واطلاق جرعة عالية. الظروف الحقلية والبيئية التي تحفز النباتات قد تؤدي الي تحقيق جرعة عالية عما هو متوقع. هذا قد يسرع من تطور عدم الحساسية بين مجاميع الحشرة).

كيف برز الاهتمام بنواحي امان الغذاء؟

لقد تم تسجيل ما يزيد عن ١٧٦ منتج - Bt مختلف للاستخدام التجاري منذ ١٩٦١ . لم ينشر ما يدل علي حدوث سمية غذائية لاثواع الفقاريات (الثدييات - الاسماك - الطيور). اظهرت دراسات التناول ان بروتين - Bt يهزم ويتكسر في سائل معدة الثدييات (احماض وانزيمات الهضم) خلال اقل من ٣٠ ثانية. لا يعرف حدوث اية تفاعلات حساسية من بروتينات الباسيلليس. بروتينات - Bt لا تحتوي علي الصفات الشائعة لاي

مسبب للحساسية. علي عكس معظم مسببات الحساسية المعروفة فانها تفقد فاعليتها بواسطة الحرارة والاحماض والانزيمات المحللة للبروتينات. كذلك فانها لا تتحول بشكل خاص بواسطة النباتات (لا يحدث لها جليكوسلة) وتوجد في تركيزات منخفضة نسبيا. بروتينات Bt سواء علي صورة مستحضرات للرش او تنتج بواسطة النباتات تعتبر شديدة الامان الغذائي.

اتجاه التكنولوجيا: الهندسة الحيوية للمبيدات الطبيعية Bioengineering

باسيليس ثوريينجنسيز (Bt) بكتريا تربة شائعة قادرة علي انتاج بلورات بروتينية تبديد الحشرات خلال السكون كجزء من دورة الحياه الطبيعية. عندما تستخدم علي المحاصيل الحقلية وفي حدائق المنازل كمحلول رش او مسحوق محبب فان البلورة او بروتين - Bt يتم تناولها خلال تغذية الحشرة. معدة الحشرة تنشط البروتين الي صورة سامة. لقد استخدمت صفة القتل هذه في نظم حماية الخضراوات والمحاصيل الاخرى خلال ما يزيد عن ٤٠ عاما. هناك صورة عديدة في بروتينات - Bt هذه وكل منها له صفات وخصائص معروفة او مدي ضيق من الفاعلية والكفاءة في اباداة الحشرات. مع التكنولوجيا الحيوية الحديثة فان الجينات اللازمة لخلق بروتين - Bt تم عزلها بسهولة وادخالها في نباتات واصبحت مكون وراثي ثابت في الصنف النباتي الجديد. لقد تم توصيف ما يزيد عن ٥٠ بروتين - Bt متميز واتضح انها تتميز بتأثيرات تثبيطية علي فراشات اللافات والخنافس والذباب والبعوض وغيرها من الحشرات الرئيسية. لقد اتضح ان تغيير حمض اميني مفرد في بروتين - Bt احدث تأثيرات ضخمة درامية في مدي وتخصصية الفاعلية ضد انواع الافات الحشرية.

التخصصية تساهم في احتمالات التطور السريع للمقاومة. الان ولو ان نوعين فقط من الحشرات اصبحتا غير حساسة لبروتين - Bt خاص في الحقل فان اكثر من عشرة انواع كونت مقاومة في الدراسات المعملية. لقد حدث ما يوجب الحذر بشكل اكبر الا وهو اكتشاف ان واحدة من اهم الافات وهي دودة براعم الدخان غير الحساسة لبروتين - Bt واحد كونت مستويات عالية من التحمل للعديد من التوكسينات البلورية للبكتريا - Bt. المقاومة المشتركة هذه تعتبر من الامور الحرجة التي تثير الجدل حول التوسع في زراعة النباتات التي تنتج بروتينات الباسيليس - Bt. استخدام معلومات تفصيلية عن ترتيبات الحمض الاميني الضروري الخاص يتسابق مطوري هذا الاتجاه لتصميم الحصول علي

بروتينات أكثر فاعلية وأكثر تخصصية أو ما تسمى "بروتينات - Bt معتدلة) تدمج عناصر المحددات الوراثية الطبيعية والمتخصصة لتدبير ومواكبة مدي فاعلية وكيفية أحداث الفعل لبروتينات - Bt. هندسة البروتينات هذه يمكن التنبؤ بها لتقديم أنشطة جديدة ضد الآفات الحشرية التي لا يعرف عنها حساسية طبيعية لبروتينات - Bt. هذا للاقتراب يستوجب وضع حلول متوافقة بيئيا والتنبؤ بأي خلل يحدث في النظام البيئي. تغير التخصص تجاه الآفات الحشرية وتحويل مكان أحداث الفعل للإبادة في الحشرة ثم أخذها في الاعتبار من قبل العديد من البحوث مما يقدم استراتيجيات ديناميكية ضرورية لإدارة المقاومة في الآفة.

من الاستراتيجيات الأخرى المقترحة استخدام "التوكسينات المساعدة helper toxins" والتي تنتج كذلك بواسطة بعض تحت أنواع باسيليس ثورينجنسيس. أظهرت الدراسات الحديثة بواسطة رجال الحشرات في جامعة UC Riverside أن الجرعات تحت القاتلة لتوكسين بروتين ثنائي Cyt A تغلبت على المستويات العالية من عدم الحساسية لبروتين - Bt في يرقات البعوض. Cyt A له موقع خلوي مستهدف مختلف عن البروتين - Bt. من المحتمل إيجاد توكسينات مرافقة Co-toxins طبيعي أو مخلق لخفساء كلورادو البطاطس وغيرها من آفات الخضر.

لمزيد من التفاصيل عن إدارة مقاومة الآفات ومنتجات Bt والتكنولوجيا الحيوية نرجع

اليوم

For More Information On Pest-Resistance Management, Bt-products, or Agricultural Biotechnology:

Pesticide Resistance Management Workgroup

Office of Pesticide Programs

U.S. Environmental Protection Agency

401 M St. S. W., Washington D.C. 20460

contact: Sharlene R. Matten or Paul I. Lewis

(703) 305-7974

matten: sharlene@epamail.epa.gov

lewis: paul@epamail.epa.gov

Information Systems for Biotechnology

120 Engel Hall

Virginia Polytechnic Institute and State Univ. Blacksburg, VA 24061-

0308 (540) 231-3747; NBIAP@VT.EDU

By Trevor V. Suslow 2/14/98

Photo Credit: Adult Colorado Potato Beetle – Clemson University Dept. of Entomology, Cooperative Extension

الاختلافات بين سلالات باسيليس ثورينجنسيز التقليدية والنباتات المهندسة وراثيا ضد الحشرات: الاسباب الممكنة للتطور السريع للمقاومة وحساسية الكائنات غير المستهدفة

من مقالة للباحث Beatrix Tappeser في معهد الايكولوجي التطبيقي - فريبيرج - المانيا اعدت للقاء في ورشة العمل عن الامان الحيوي التي عقدت في الفترة من ١٣-١٧ اكتوبر ١٩٩٧ في مونتريال - كندا. لقد اكتشفت Bt بواسطة Ernst Berliner عام ١٩١١ عندما وجد ان شحنة الدقيق المرسلة من thuringia معدية بمرض معدي. بعد تعريف بعض صفات هذا الباسيليس بما فيها التخصص العوائلي لم يمر وقت طويل حتي اجريت التجارب الاولى للوقوف علي فعاليتها في مكافحة ثاقبة الذرة (١٩٢٨-١٩٣١). ولم يمر وقت فيما قبل الحرب العالمية الثانية حتي ظهرت المشاكل الاولى مع المبيدات المخلقة مما ادي الي بذل محاولات كبيرة لتثبيت الباسيليس ثورينجنسيز كمبيد حيوي (krieg ١٩٨٦). في عام ١٩٩٥ وصل حجم السوق لمستحضرات Bt الي ما يقرب من ٩٠ مليون دولار امريكي وتم تسجيل ٦٧ مستحضر علي مستوي العالم (kumar واخرون ١٩٩٧). لقد قدر ان مستحضرات Bt تمثل ٨٠-٩٠% من كل المبيدات الحيوية. علي العكس فان نصيب هذه المستحضرات لم تتعدى ١-٢% من السوق العالمية الكلية للمبيدات وهناك زيادة مستمرة منذ بداية التسعينات. اظهرت الاستطلاعات التي اجريت عام ١٩٩١ تنبؤ الكثير بانه بحلول عام ٢٠٠٠ فان مستحضرات Bt سوف تصل الي ٥-١٠% من سوق المبيدات العالمي (UTZ Bernhard عام ١٩٩٣). الافات الرئيسية المستهدفة مع المبيدات الحشرية البكتيرية Bt تشمل العديد من حشرات حرشفية الاجنحة (ابي دقيقات) وثنائي الاجنحة (الذباب والبعوض) وبعض افراد غمدية الاجنحة (الخنافس). لقد وجد ان بعض السلالات تقتل النيماتودا (الوارد واخرون ١٩٨٨ ، كريج وفوانز ١٩٨٩). مستحضرات Bt التقليدية مثل تلك التي سجلت في المانيا وكذلك علي مستوي العالم اشتقت من السلالة عالية الفاعلية باسيليس ثورينجنسيز كورستاكي HD-1 والتي تم عزلها في الستينات (Dulmage ١٩٧٠).

خصائص سلالات Bt الموجودة في المستحضرات البكتيرية الباسيلية التقليدية:

معظم مستحضرات Bt متوفرة في الاسواق وجميعها تخضع لتصاريح وتراخيص فردية تحثوي علي الجراثيم مع الاجسام الضمنية الباراسبورية التي تتكون من الدلتا-اندوتوكسينات. حتي الان تم عزل ٥٠ من جينات دلتا-اندوتوكسين المختلفة تقع في ١٦

تحت مجاميع (crickmore واخرون ١٩٩٦). هذه الجينات يمكن ان تحدث في سلالات مختلفة وفي خلائط عريضة متنوعة. في الغالب فان سلالات Bt تكون قادرة لتكوين اكثر من نوع واحد من الاجسام البلورية الضمنية وهذه قد تكون انواع مختلفة من جزيئات الدلتا-اندوتوكسين. لقد تم تقسيم سلالات Bt تبعا لبروتينات الغشاء وجينات الاندوتوكسين او التوكسين التي تحتويها. بعد ذلك تم تقسيم Bt دلتا-اندوتوكسين عن طريق تتابع تجانس جيناتها والتخصص علي الحشرات. كل سلالة Bt فيها عدد مختلف من البلازميد مسنولة عن تخليق الاندوتوكسينات المختلفة. السلالة HD-1 تاوي علي الاقل خمسة بلازميدات مختلفة. البلازميدات يمكن ان تحمل العديد من جينات التوكسين وهي في العادة متماثلة. بالاضافة الي ذلك فان باسيليس ثورينجنسيس وجدت تحمل transposons التي تساهم في حدوث النباتات الوراثية الكبيرة في جينات التوكسين الخاصة بها ومن ثم في التوكسينات نفسها. هذا يفسر التنوع الكبير في سلالات Bt. لقد وجد ان سلالات Bt تستطيع تبادل بلازميداتها من خلال عمليات مشابهة للارتباط كما يحدث في معدة يرقات الحشرات. في هذا السبيل فان سلالات Bt يمكن ان تتبادل البلازميدات التي تحتوي علي جينات الدلتا-اندوتوكسينات ومن ثم تعبر عن نظم فاعلية مختلفة في الانواع المختلفة من حشرات حرشفية الاجنحة. الجراثيم وجزيئات التوكسينات البلورية تفقد نشاطها بسرعة عندما تتعرض للاشعة فوق البنفسجية UV-light.

تركيب جينات التوكسين والبروتينات: بعض التراكيب الشائعة لجينات Bt توكسين انت الي الاقتراح بوجود تباين داخلي built-in مما يعطي البكتريا Bt مرونة كبيرة في احداث الفعل في حشرات مستهدفة مختلفة. كما هو الحال مع الاجسام المضادة التي تحتوي علي صفات محفوظة ومتباينة فان جينات التوكسين والبروتينات تصنع من مناطق تبادلية محفوظة ومتباينة. الجزء الطرفي N لبروتين التوكسين مسئول عن السمية والتخصصية ويحتوي خمسة مناطق محفوظة. الجزء الطرفي C عادة محفوظ بشكل كبير ويحتمل ان يكون مسؤولا عن تكوين البلورة.

دورة العدوي Infection cycle: الخطوة الاولى في دورة العدوي بعد تناول الجسم البلوري الضمين للباسيليس Bt تتمثل في اذابة البروتينات البلورية في الوسط القلوي لمعدة الحشرة الي بروتينات ذات احجام ١٣٠-١٤٠ كيلودالتون Kda. تعتمد كفاءة اذابة

بلسورة البروتين علي الوسط السائد في معدة وتركيب الاجسام الضمنية الباراسبوروية. في الخطوة الثانية فان البروتين المذاب يتعرض للانقسام البروتيني بالتحلل وهذا يعطي التوكسين الفعلي وهو شريحة البروتين بحجم ٦٠-٦٥ كيلودالتون. عملية التحلل البروتيني قد تتكون وتشمل من ٥ وحتى ٧ خطوات (Choma واخرون ١٩٩٠). الشريحة السامة النهائية لمعظم البروتينات المشتركة هي (٢) cry IA والتي يعتقد انها تحتوي علي احماض امينية ٢٩-٦٠٨ كما تم حصرها من النهايات الطرفية N (هوفت وويتلي ١٩٨٩). هذا البروتين المنشط ينتشر خلال الغشاء الغذائي Peritrophic غير المنفذ للبروتوكسين المذاب غير المخمر ذات الحجوم ١٣٠-١٤٠ كيلودالتون ومن ثم يعمل كنوع من الغربال الجزيئي. حينئذ يرتبط التوكسين بمستقبلات متخصصة تقع في معدة الحشرة. بناء علي المعلومات حاليا فان هذا يؤدي الي تكوين ثقب وما يتبعها من تحطم التدرجات الايونية. هذه الثقوب تسمح كذلك لخلايا Bt الخضرية بالانبات من الجراثيم كي تهاجر في الهيموليمف وتطور عملية السمية من خلال احداث السمية البكتيرية bacteriaemia (Marrone and Macintosh ١٩٩٣). لزم طويل ساد الاعتقاد بان الفعل الابادي علي الحشرات لبكتريا باسيليس ثورينجنسيس تقع اساسا في الجراثيم والاجسام الضمنية. حتي ١٩٩٥ لم يكن قد اكتشف kurstakolin وهو عامل اضافي يحفز النمو مما يزيد من سمية مستحضرات بكتريا Bt بنسبة ٣٠% في الراشح من مزارع الباسيليس (Asano and Hori ١٩٩٥). لقد ادي ذلك الي الاقتراح بان الفعل الابادي لبكتريا Bt علي الحشرات يتكون من تداخلات عالية التعقيد بين البكتريا والعائل الحشري الخاص به.

العلاقات الداخلية بين العائل-المرض/تطور المقاومة:

اذا اخذنا جانب المرض نجد تنوع كبير لجينات التوكسين والتي يمكن ان تحدث في خلائط مختلفة داخل السلالة وتكون قادرة علي التبادل بين السلالات في خلال عمليات مشابهة للارتباط. اخذ مميزة التباين والمناطق المحفوظة وتتابعات الانتقال او النقل العرضي تصبح جينات التوكسين مجبرة للنقل المتعدد والدمج مما ادي الي اقتراح ان التباين الكبير في بكتريا Bt يرجع ايضا الي التركيب الفردي لاي جين توكسين. الفعل الابادي لبكتريا Bt علي الحشرات يحفز بواسطة تحفيز التسمم البكتيري بعد ارتباط بروتينات التوكسين مما يؤدي الي تكوين ثقب في جدار الامعاء وكذلك من خلال عوامل النمو التي اكتشفت حديثا. هناك مطلبان سابقان ومحددان للعدوي في جانب العائل وهما: بيئة المعدة يجب ان يسمح بالذوبان الكافي للجسم او الاجسام الضمنية البللورية ، ان

العوائل التي بها البروتيزيس الخاص بها تكسر السموم الاولى المذابة protoxins بما يحقق انتاج توكسينات فعالة في هجوم مناسبة. هذا ضروري اذا كان علي البروتينات ان تنتشر خلال غشاء الغذاء حتي تصل الي المستقبلات الخاصة بها في جدار المعدة. لقد تجمعت ادلة تنادي بان الحشرات قد طورت فعلا وسائل دفاعية خاصة وغير خاصة تعمل عند مستويات مختلفة لحمايتها ضد الفعل الالبادي علي الحشرات من بكتريا Bt بمجرد تناول الاجسام الضمنية البلورية. تخصصية المستقبل تفترض دور محدد واضح في هذه الوسيلة الدفاعية. قبول العائل لاذابة البلورات واستكمال الدور بواسطة الانزيمات المحللة للبروتينات "بروتيزيس" لا تمر بدون تأثيرات ولكن دورها في ظهور وتطور المقاومة ذات اهمية كبرى علي ما يبدو. هذه العوامل ذات تأثير قوي علي فعالية الاندوتوكسين في العوائل الحساسة وربما يكون في العوائل غير المستهدفة. غياب ضرورة اذابة جزيئات الاندوتوكسين وكسرها أي البروتين الي هجوم اصغر في الحشرات التي تتغذي علي النباتات المحورة وراثيا قد يكون لها تأثير علي حساسية الكائنات غير المستهدفة. لسوء الحظ لا توجد بحوث لتقييم الاختلافات بين مستحضرات Bt الثابتة بدون تغيير وشركائها من نوات التحويل بالهندسة الوراثية.

في الوقت الراهن يوجد القليل من التقارير التي تشير الي بعض انواع الحشرات التي كانت حساسة في البداية ثم كونت مقاومة بعد الاستخدام المكثف لمستحضرات الباسيلليس Bt في الحقل. بعض الدراسات استخدمت التوكسينات المنقاه مما اتاح لهم محاكاة موقف النباتات المهندسة وراثيا لحد بعيد ولكن ليست محاكاة لمستحضرات Bt التقليدية. لقد كونت حشرة واحدة أي نوع واحد فقط وهو الفراشة ذات الظهر الماسي مقاومة لبكتريا Bt في مجاميع الحشرات في الحقول المفتوحة مع ان المقاومة تكرر حدوثها في المعامل. لقد اظهرت دراسة حديثة امكانية حدوث مقاومة سريعة. لقد وجد Gould وآخرون ١٩٩٧ تكرارية الليلات المقاومة تساوي 1.5×10^2 في دورة اللوز الامريكية وهي افة خطيرة في زراعات القطن. هذا التقدير يتعدي المستوي الاعلي لاية تقديرات مستخدمة لحساب المدي الزمني لتطور المقاومة. دودة اللوز الامريكية حساسة جدا لمستحضرات Bt. لذلك خلص الباحث الي انه يلزم ١٠ سنوات كي تمثل المقاومة مشكلة خطيرة في مجاميع الحشرات هذه. هذه التقديرات تاخذ في الحسبان ان ٤% ماوي اتبعت كاستراتيجية كما اقترح بواسطة وكالة حماية البيئة الامريكية.

الانواع الاخرى من الحشرات مثل دودة لوز القطن وثاقبة الذرة الاوربية وجدت اقل حساسية. لقد قام مقدمي هذه المقالة بحساب مجاميع تعداد هذه الافات وقالوا انها

ستصبح مقاومة خلال ٣-٤ سنوات حتي مع مساحة ماوي ٤% حيث ستعطي نفس تكرارية الليلات المقاومة. هذه الفترة تعتبر قصيرة للاستغلال الفعال لمعظم وسائل مكافحة الحيوية حيث لا وقت وهو غير كافٍ كذلك لاسترجاع الاستثمارات التي انفقت في الحصول علي وتطوير النباتات المهندسة وراثيا ببكتريا Bt. كلونة اثنين او اكثر من توكسينات Bt يفترض ان تطيل من الفترة اللازمة لتطور المقاومة لانه يفترض ان الفطريات غير المرتبطة او المستقلة مطلوبة لمضادات كل توكسين. لقد اوضح Tabashrik ومعاونوه (١٩٩٧) ان المقاومة المشتركة لاربعة توكسينات مختلفة قد ترجع الي واحد من الجينات الذاتية الجسيمة المنتخبة والتي تحدث مقاومة متناهية في الكبر لهذه التوكسينات في سلالة واحدة من الفراشة ذات الظهر الماسي. يعتقد بعض الباحث ان الحدوث القليل للمقاومة في الحقل لابد وان يحدث في وجود جينات توكسين متعددة في السلالات الفردية لبكتريا Bt. لقد اظهرت دراسات قام بها Dai and Gill ان البعوض الذي عومل بالباسبيليس اسرانيليميز لاكثر من ٢٠ جيل ثم تعرض لمستحضر اندوتوكسين الجرثومي او لمستحضر التوكسين المنقي انه قد حدثت درجة متوسطة من المقاومة في الحالة الاولى (ثلاثة امثال) مقارنة بسبعين مثل في الثانية. حقيقة ان تطور المقاومة في الحقل المفتوح مع مستحضرات Bt التقليدية نادرة الحدوث جدا مما يحجب الرؤية عن معنوية الفروق بين النباتات المهندسة وراثيا المقاومة للحشرات والمستحضرات البكتيرية التجارية.

النباتات المحورة وراثيا المقاومة للحشرات Insect resistant transgenic plants

كقاعدة عامة فان النباتات المقاومة للحشرات المحورة وراثيا يتم هندستها عن طريق جينات التوكسين الفردي المعزول. حقيقة ان الكود او الشفرة الوراثية للنباتات تختلف قليلا عن تلك الخاصة بالبكتريا مما يجعل من الضروري استخدام جينات مخلقة والتي تم فيها تغيير تتابع النيوكلويتيد بطريقة تجعله محافظا ومستمر في تشفير تتابع الحمض الاميني البكتيري المطلوب. من غير الممكن استخدام جينات توكسين كاملة في النباتات لانها غير ذاتية بشكل كافٍ في الخلايا النباتية (التوكسينات الاولى هي فقط التي تنوب مع درجة حموضة اعلي من ٩,٥، بينما الحموضة في الخلايا النباتية حوالي ٧,٦). لقد امكن التغلب علي هذه المشكلة باستخدام جينات متفرعة قادرة علي انتاج جزيئات كاملة للتوكسين المنشط وتستقر في الخلية النباتية في صورة مذابة. الذرة المقاومة للحشرات والذي تم هندسته وراثيا بواسطة شركة سيبا (الان نوفارتس) تحتوي علي نسختان من الجين

المتفرع المخلق (b) cry IA. هذا الجين يحتوي على ٦٤٨ حمض اميني الاولي في التوكسين الاولي والذي يتكون في العادة من ١١٥٥ حمض اميني. بسبب تحويله وتكيفة مع الشفرة الجينية او الوراثة التي تستخدم بواسطة النباتات فان التتابع النيوكلو تيدي للجين المخلق ٦٥% فقط تجانسا مع الجين الاصلي. الجين المخلق يلحم في البداية مع البادئ فوسفوانبول بيروفات كربوكسيلز للذرة وهو المسئول عن خلق البروتين في كل الانسجة الخضراء للذرة، ثانيا للبادئ الخاص في حبوب اللقاح للذرة والتي تمكن من خلق البروتين في حبوب اللقاح. البروتين الباقي ذي ٦٤٨ حمض اميني يحتمل ان يمر بعد ذلك بخطوتان او ثلاثة نحو التحلل والكسر في البيئة القلوية قبل ان يصبح بروتين باقي ٥٦٤ - ٥٧٨ والذي اعلنت شركة نوفارتس انه توكسين كامل الفاعلية. تبعا لمصادر اخري فان التوكسين النشط الفعال في اكثر صورة المتفرعة يملك احماض امينية ٢٩-٦٠٧. هذا يعطي دليل ان البروتين الفعال يملك ٥٧٨ حمض اميني والثمانية والعشرين الباقية تزال او تزال N-الطرفية وC-الطرفي.

لقد استتبع ذلك التاكيد بان النبات المقاوم للحشرة يحتوي على نسخة متفرعة من جين الدلتا-اندوتوكسين والتي تخلق بروتين بادئ قصير والذي يخلق من خلال دورة النمو الخضري ويستقر في النبات في صورة مذابة. نظرا لحجم الصغير يصبح محتملا ان جزئ التوكسين المذاب يمكن ان ينتشر مباشرة خلال الغشاء الغذائي بدون اية خطوات انقسام لاحق. لا توجد خلفية وراثية عن جينات التوكسين المختلفة كما لا توجد محفزات للسمية في الوقت الحالي ولا توجد احتمالات لحدوث التسمم البكتيري لتعضيد الفعل القاتل للمرض.

بعض الاستنتاجات الهامة: الوسائل التي تؤدي الي حدوث تغيرات هامة في التداخل بين العائل والممرض والتغيرات التي تؤدي الي تحفيز تطور المقاومة ربما تكون ذات درجات من الكبر والقيم المتباينة. بالاضافة الي ذلك فان هناك بعض الارشادات والاقاويل ان النباتات المهندسة وراثيا لا تنتقل وسائلها السامة الي الحشرات الاخري غير الافات بطريق غير متوقع. تغذية الحشرات النافعة علي يرقات سامة من ثاقبة الذرة الاوربية ادت الي قتل اثنين او ثلاثة من هذه الحشرات النافعة. حتي تغذيتها علي يرقات غير حساسة لانواع اخري ادت الي قتل هذه المفترسات التي تغذت علي هذه اليرقات. لقد اجريت هذه التجارب بواسطة بحاث سويسريون في المحطة القومية للبحوث الزراعية والا يكلوجيا

الزراعية. التأثيرات علي الكائنات النافعة غير المستهدفة ظهرت مع حشرة الكولومبولا وقد اتضح ان التأثيرات غير قليلة. يبدو اننا في حاجة للاسراع بمناقشة وضع وجدوي وسبل الحفاظ علي النباتات المقاومة للحشرات كاحد اهم الوسائل الحيوية البديلة للمبيدات التقليدية. هذا يستدعي عمل ميثاق شرف لمنع التلوث الوراثي GENETIC.POLLUTION غير التهجين. التوكسين المحور او المتغير قد تكون له المقدرة علي قتل الاخرين ناهيك عن الكائنات غير المستهدفة. هناك ادلة متوفرة في الوقت الراهن تشير الي النباتات المقاومة عن طريق الهندسة الوراثية لها تأثيرات سلبية علي الزراعة المتواصلة والبيئة. لذلك يجب اجراء تقويم للمخاطر المبنية علي الاسس العلمية واخذها في الحسبان وعدم تجاهله.

Literatur

- Asano S and Ilori II (1995) Appl. Entomol- Zool. 30 (2), 369-374, xitirt nach Kumar PA, Sharma RP, Malik VS (1997) The Insecticidal Proteins of Bacillus ihuringiensis. Advances in Applied Microbiology 42, 1-43
- Bernhard K and Utz R (1993) Production of Bacillus thuringiensis Insecticides for Experimental and Commercial Uses. in; Entwistle PK, Gory JS, Bailey, MJ, Iliggs S (Eds.) (1993) Bacillus ihurlngi.ensis, An Environmental Biopesticide; Theory and Practice. John Wilcy & Sons, Chichester UK-
- Crickmore N, Zcigler DR., Fcitelson J, Schnepf E, Lambert B, Lcreclus D, Baum J, Dean DII (1996) Genes Microbiol. Rev., y.itirt nach Kumar PA, Sliarma RP, Malik VS (1997) The Insecticidal Proteins ofBacillus thuringiensis. Advances in Applied Microbiology 42, 1-43
- Edwards DL, Payne J, Scares GG (1988) Novel isolates of Bacillus thuringiensis having activity against nematodes. European Patent Application, EP 0 303 426 A2
- Environmental Protection Agency (1995) Pesticide fact sheet; 'Bacillus thuringiensis' CryIA(b) delta-endotoxin and the genetic

material necessary for its production (plasmid vector pDB443 1) in corn. Washington, DC

Gould F, Anderson A, Jones A, Sumerford D, Ilcckcl DG, Lope/- J, Micinski S, Leonard R, Laster M (1997) Initial frequency of alleles for resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in Held populations of *Heliothis virescens*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 3519-3523

Hofte II, Whitcley II R (1989) Insecticidal Crystal Proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiological Reviews* 53, 242-255

K-ricg A und Franx JM (1989) *Lehrbuch der biologischen Schadlingsbekämpfung*. Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg

Kricg A, Hugcr AM (1986) Symposium in memoriam Dr. Ernst Berliner, Dan-nstadt 25.8.1986. Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt (Tier Land- und Forstwirtschaft, Berlin-Dahlem, Hca 233

Kumar PA, Sharma RP, Malik VS (1997) The Insecticidal Proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Advances in Applied Microbiology* 42, 1-43

Lercdus D, Delccluse A, Lecadct MM (1993) Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and Genes. In: Entwistle et al. (1993), a.a.O., S. 255 - 267

Marronc PG and Macintosh SC (1993) Resistance to *Bacillus thuringiensis* and Resistance Management. In: Entwistle et al (1993), a.a.O., S. 221 - 235

Perlak FJ, Fuchs RL, Dean DA, McPherson SL, Fischhoff DA (1991) Modification of the coding sequence enhances plant expression of insect control protein genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 3324-3328

Tabashnik BE (1994) Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annual Review of Entomology* 39, 47 -79

Tabashnik BE, Liu Y-B, Finson N, Masson L, Ilcckcl DG (1997) One gene in diamondback moth confers resistance to four *Bacillus thuringiensis* toxins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 94, 1640 -1644

Visser B, Bosch D, Ilonec, G (1993) Domain-Function Studies of *Bacillus thuringiensis* Crystal Proteins: A Genetic Approach. In: Entwistle et al. (1993), a.a.O., S. 71 - 88

بعض الجوانب الخاطئة عن السمية والسلوك البيئي للباسيلليس ثورينجنسيز:

الباسيلليس ثورينجنسيز (B) كائن دقيق حي يقتل بعض الحشرات كما يستخدم في القضاء علي الحشرات الضارة غير المرغوبة في الغابات والزراعة والمناطق الحضرية. في الصورة المنقاه فان بعض البروتينات التي تنتج بواسطة Bt ذات سمية حادة علي الثدييات. هذا بينما في الصورة الطبيعية تكون السمية الحادة للاصناف الشائعة المستخدمة في Bt محدودة علي يرقات الحرشفية الاجنحة ويرقات البعوض والخنافس. Bt ترتبط قريبا من B.cereus وهي البكتريا التي تسبب تسمم غذائي و B.anthraxis وهي وسيلة مرض الجمرة الخبيثة anthrax. لقد اجريت قليل من الدراسات علي التأثيرات الصحية المزمنة والسرطانية والطفرية لبكتريا الباسيلليس Bt. الافراد الذين يتعرض لبكتريا Bt تتكون من حساسية في التنفس والعيون والجلد كما حدثت حالة قرحة في القرنية بعد التلامس المباشر لمستحضر Bt. كذلك يعاني الناس من الحساسية من المواد الخاملة (السرية في تجهيز المستحضرات). لقد وجد ان الناس الذين لديهم اجهزة مناعية سليمة قد يكونون ذوي حساسية خاصة لبكتريا Bt. جراثيم Bt الحية تبقى لمدة سنة علي الاقل بعد المعاملة. لقد تم توثيق مقاومة الحشرة لبكتريا Bt. الهندسة الوراثية قد تؤدي الي توسيع دائرة استخدام Bt واسرع حدوث مقاومة اكثر. التطبيقات الواسعة لبكتريا Bt قد تحدث تأثيرات ايكولوجية Bt. تستطيع احداث خفض كبير في عدد وانواع الحشرات والفرشات مما قد ينعكس علي احداث تأثيرات ضارة علي الطيور والثدييات التي تتغذي علي الحشرات التي عولمت بالبكتريا. بالاضافة الي ذلك فان عدد من الحشرات الناطقة تتاثر عكسيا بواسطة Bt.

بكتريا Bt اقل سمية علي الثدييات كما اظهرت تأثيرات قليلة علي البيئة بالمقارنة بالعديد من المبيدات الحشرية المخلقة. لذلك لا يوجد سبب لاستخدامها باسلوب مختلف عن المألوف مع المبيدات الاخرى. لذلك فان تأثيراتها البيئية والصحية وكذلك ما يتعلق بكل البدائل الاخرى يجب ان تؤخذ في الاعتبار قبل ان يسمح باستخدامها Bt يجب ان تستخدم فقط عند الضرورة وبكميات اصغر بقدر الامكان. كذلك تستخدم كجزء من برنامج الادارة المتواصلة. حيث انه قد سجلت اضرار المبيدات التقليدية واسعة الانتشار فان البحاث ينظرون فقط للمبيدات التي تحدث سمية فقط علي الافة المستهدفة والتي تكون اقل تأثيرا علي الانواع الاخرى كما لها قليل من الاضرار البيئية. الباسيلليس ثورينجنسيز (Bt) مبيد حشري من نتاج هذه البحوث. هناك دليل يقترح ان Bt ليست هي الوسيلة المعتدلة

benign كما يريد الصناع ان يقنعونا مما يستدعي اتخاذ الحذر مع استخدامها. الباسيلليس Bt نوع من البكتريا التي لها فعل ابادي ضد الحشرات تؤثر علي مدي اختياري من رتب الحشرات. يوجد ما يقرب من ٢٤ تحت نوع من Bt (وهي تسمى طرز سيروولوجية او اصناف) وتحمل وجود اكثر من ٨٠٠ عزلة سلالية. لقد تم عزل Bt لأول مرة كما سبق القول في عام ١٩٠١ في اليابان من يرقات دودة الحرير المريضة. بعد ذلك عزلت من فراش دقيق البحر المتوسط واطلق عليها الباسيلليس ثورينجنسيز في عام ١٩١١. حتي عام ١٩٥٨ لم تستخدم Bt عل نطاق تجاري في الولايات المتحدة الامريكية. بحلول عام ١٩٨٩ اصبحت منتجات Bt تمثل ٩٠-٩٥% من سوق المبيدات الحيوية.

الباسيلليس ثورينجنسيز في صورة المنتجات المتاحة في اسواق امريكا تشمل خمسة اصناف Bt وهي كورستاكي، موريسوني والتي تحدث مرضية في الفراشات والديدان، اسراييلينسيز التي تسبب المرضية في يرقات البعوض والذباب الاسود، ايزاوايا التي تسبب المرضية في يرقات فراشة الشمع، تينيبيريونيس والتي يطلق عليها ايضا الصنف سان ديجو والتي تسبب مرضية في يرقات الخنافس. لقد اكتشفت سلالات اخري من Bt ذات فعل ابادي علي الحشرات والنيماتودا والاكاروسات والديدان المفلطة والبروتوزوا، تستخدم منتجات Bt في مكافحة الافات الحشرية في بساتين الفاكهة والخضراوات ومناحل العسل والذباب الاسود والبعوض في البحيرات والمستنقعات وغيرها من افات الخنافس في الخضراوات واشجار الظل. الاسماء التجارية الشائعة تشمل ديبيل ، فوراي ، ثوروسيد (كورستاكي) وفيكتوباك، موسكيتو اتاك (اسراييلينسيز) وام تراك (تينيبيريونيس).

كيفية احداث الفعل Mode of action: عندما لا تكون ظروف النمو غير مناسبة لبكتريا Bt فانها كغيرها من البكتريا تكون جراثيم. الجراثيم مرحلة سكون في دورة حياة البكتريا حيث ينتظر الكائن من خلالها حتي تتحسن ظروف النمو الافضل. علي عكس العديد من البكتريا الاخري فانه عندما تنتج بكتريا Bt الجراثيم فانها تخلق ايضا بللورات البروتين هذه البللورات تمثل المكون السام للباسيلليس Bt. بعد ان تقوم الحشرة بتناول Bt تذوب البللورات في معدة الحشرة القلوية. بعدئذ تقوم الانزيمات الهاضمة في الحشرة بتكسير تركيب البللورة وتنشيط المكون الابادي ضد الحشرات للباسيلليس Bt والذي يطلق عليه دلتا-اندوتوكسين. يقوم الدلتا-اندوتوكسين بالارتباط بالخلايا المبطنه لغشاء المعدة ويحدث ثقوب في الغشاء مما يحدث خلل في التوازن الايوني في المعدة. في الحال تتوقف الحشرة

عن التغذية وتَجوع حتى الموت. اذا لم تكن الحشرة حساسة للفعل المباشر للدلتا-اندوتوكسين يحدث الموت بعد بداية البكتريا Bt في النمو الخضري داخل معدة الحشرة. يحدث انبات للجراثيم بعد كسر غشاء المعدة ثم تتكاثر وتنتج جراثيم اكثر. هذه العدوي العريضة للجسم تحدث قتل للحشرة.

العوامل التي تؤثر على الاختيارية Factors affecting selectivity

من اكثر الخصائص المطلوبة في بكتريا الباسيلليس Bt الاختيارية، حيث ان بعض انواع الحشرات هي الحساسة فقط للدلتا-اندوتوكسين. لقد قام العلماء بتعريف ٢٩ نوع علي الاقل من البللورات والدلتا-اندوتوكسينات، كل منها فعال ضد حشرات معينة. كل صنف من Bt يستطيع انتاج واحد او اكثر من هذه التوكسينات. المحاليل القلوية (قاعدية - درجة حموضة اكثر من ٧) تنشط الدلتا-اندوتوكسين والاصناف المختلفة من البكتريا تتطلب درجات حموضة مختلفة. بعض الانزيمات يجب ان توجد في معدة الحشرة لكسر البلورة الي عناصرها السامة. بالاضافة الي ذلك فان بعض صفات الخلية في معدة الحشرة تشجع ارتباط الاندوتوكسين وما يستتبع ذلك من تكوين النقوب. عمر الحشرة يعتبر من العوامل المؤثرة كذلك فقد وجد ان اليرقات الصغيرة اكثر حساسية من اليرقات كبيرة العمر.

اختبارات التأثيرات الصحية: حيث ان Bt كائن ميكروبي حي فان اختبار الاضرار الممكنة للباسيلليس تجري بشكل مختلف عما يحدث مع المبيدات التقليدية. السمية الميكروبية توصف بالمرضية (قدرة الميكروب علي احداث المرض) والعدوي (قدرة الكائن علي التكاثر في الجسم). وكالة حماية البيئة الامريكية EPA لا تطلب اختبارات عن السرطانية والضرورية والسمية الجديدة لبكتريا الباسيلليس Bt.

الاختبارات المعملية عن السمية الحادة: كل واحد من بين اكثر من ٨٠٠ سلالة من Bt قد يحدث سمية مختلفة علي الحشرات والقوارض والانسان. هذه الحقيقة تعقد من أي مناقشة عن سمية Bt. فيما يلي ملخص للسمية الحادة لنوعين شائعين من اصناف Bt.

١- باسيلليس ثورينجنسيس الصنف كورستاكي (Btk): بكتريا Btk ومنتجاتها التجارية عادة لها سمية حادة قليلة عن طريق الفم علي الجرذان. في الاختبارات علي حيوانات المعامل لم يلاحظ الباحث ايه تاثيرات معاكسة بعد التغذية علي جرعات كبيرة. بعض

انواع التعرض الاخرى اظهرت بعض التأثيرات الحادة. الجرذان التي قامت باستنشاق الهواء المحتوي على جراثيم Btk عانت من هبوط في التنفس كما ان جراثيم Btk التي حقنت في اوردة الجرذان احدثت تقاوم في الامراض التي كانت موجودة مسبقا. كلا Btk والفوراي 4&B تسببا هياجا في جلد الجرذان بينما الفوراي 4&B يحدث هياج في العيون بشكل متوسط.

٢- باسيليس ثورينجنسيز الصنف اسرائيلينسيز (Bti): في دراسات تقييم السمية الحادة لبكتريا Bti على الثدييات حدث الموت فقط عندما حقنت Bt في البطن او المخ. في دراسة واحدة اجريت على الجرذان حدثت نسبة موت ٧٩% بعد حقنه واحدة في المخ. قد تحدث تأثيرات اخرى بخلاف الموت ومثال ذلك ما حدث من تضخم الطحال عند حقن الفئران بمعلق Bti. مستحضر Bti يحدث هياج وحساسية في الاعين والجلد. ان حقن جراثيم Bti الحية وغير النشطة تحت الجلد ادت الي حدوث وتكوين خرايج في الجرذان. لقد حدثت حساسية وهياج في عيون الارانب من جراء التعرض Bti بدرجات مختلفة تعتمد على المواصفات الطبيعية للمستحضر وقد وجد ان مستحضرات التعفير ذات احجام الجسيمات الصغيرة اقل احداث للهياج كما تتضمن من العيون بسرعة اكثر من المستحضرات المتكثفة ذات الجسيمات الاكبر حجما. في الصورة المنقاه كان الاندوتوكسين الخاص ببكتريا Bti سام بشكل واضح على الثدييات. عندما تم حقن الدلتا-اندوتوكسين من Bti في اوردة الجرذان حدث شلل سريع تم خلال ساعة. عندما تم حقن نفس الجرعة في الجرذان المرضعات حدث الموت خلال ٢-٣ ساعات. بسبب الدلتا-اندوتوكسين كذلك تحطم في خلايا الدم الحمراء في الجرذان والفئران والاغنام والاحصنه والانسان. عندما تم عزل بروتين صغير من الاندوتوكسين ومعاملته في الجرذان بجرعات غير قاتلة عانت الجرذان من سخونة شديدة وخفض في ضربات القلب.

السمية الحادة على الانسان Acute toxicity to humans:

١- باسيليس ثورينجنسيز الصنف كورستاكي: لقد اجريت دراسات قليلة لتقييم سمية Btk على الانسان. لقد تحصل على معظم المعلومات من التعرض المهني او من التعرض الحادث خلال البرامج التوسعية لبكتريا Btk. لقد حدثت حالة عدوي واحدة من فلاح حدث تناثر لمستحضر الديبيل Btk في العيون حيث حدث له قرحة في

القرنية وقد تم عمل مزارع Btk منها. رجل اخر كان يعمل في برنامج الرش وتناثرت البكتريا Btk علي وجهه وعيونه ثم حدث للرجل هياج في الجلد وحروق وانتفاخ واحمرار. لقد تم زراعة مزرعة من عينة اخذت من عيون هذا الرجل. لقد وردت تقارير تفيد بان عمال الرش الارضي لمستحضر Foray 48B ظهرت عليهم اعراض من هياج وحساسية في الاعين والانف والحلق والجهاز التنفسي. لقد تاكد ان شدة الحساسية ترتبط بدرجة التعرض. العمال الذين يعانون من مشاكل صحية مسبقة كانوا اكثر معاناه من التأثيرات المعاكسة من جراء الرش الارضي بهذه المستحضرات البكتيرية. لقد نقلت امرأة تعرضت لانجراف مستحضر Btk الي المستشفى بسبب حدوث التهابات والهرش والانتفاخ في وجهها واعلي الصدر. بعد ذلك تطورت الاعراض الي ظهور حمي وفقد الوعي ونوبات الغيبوبة. لم يمكن زرع Bt من عينات نسيجية منها ولكن الاطباء المعالجون لهذه السيدة يعتقدون ان Bt كانت المسبب للاعراض الاكلينيكية (السريية).

اظهرت دراسات الحصر او الاستكشاف بعد برامج الرش الموسع ببكتريا Bt ان الناس الذين تعرضوا يحملون البكتريا Bt في انسجة الجسم. مثال ذلك ان اكثر من ١١% من عينات سحبة الانف التي اخذت من المصابين تحت العلاج في فانكوفر بكندا بعد برنامج الرش ضد الفراشة الغجرية وجدت تحتوي علي Btk. لقد وجدت البكتريا Bt كذلك في المزارع التي اخذت من مصابين في مقاطعة لين كاونتي-اوريجون بعد برنامج الرش ضد الفراشة الغجرية هناك. اظهرت دراسات الحصر كذلك ان الناس الذين تعرضوا للرش عانوا من مشاكل صحية مختلفة يعتقد انها مرتبطة بالتعرض لبكتريا Bt. مثال ذلك انه خلال برنامج الرش في فانكوفر ظهرت مشاكل صحية علي ٢٥٠ انسان معظمها كان في صورة حساسية او اعراض تشبه الانفلونزا. خلال برنامج مكافحة الفراشة الغجرية في واشنطن ظهرت مشاكل صحية فيما يزيد عن ٢٥٠ انسان عولج ٦ منهم في غرف الطوارئ من الحساسية والربو. لم يستطيع الاطباء الربط الدقيق بين التعرض لبكتريا Bt والمشاكل الصحية هذه.

٢- باسيليس ثورينجنسيس الصنف اسرائيلينسيس: لقد تم تسجيل حالة واحدة فقط عن التأثيرات المعاكسة للبكتريا Bti علي الانسان. لقد تناولت هذه الحالة باحث قام بحقن نفسه بخليط من Bti ونوع اخر من البكتريا شائع وجودة علي الجلد في الانسان. لقد عاني هذا الباحث من تفاعل سام وحدث هياج في الاوعية الليمفاوية. عندما حقنت هذه

البكتريا بعد ذلك في القوارض كان هذا المخلوط ذات تأثيرات سامة بشكل ثابت ولكن عندما تم حقن كل نوع من البكتريا علي حدة حدث هياج قليل في الجلد slight inflammation.

بعض النواحي الخاصة عن سمية بكتريا Bt: Special concerns

التوكسينات الخارجية Exotoxins: الاختبارات الاولى التي اجريت للكشف عن سمية بكتريا Bt اجريت علي الصنف ثورينجنسيز وهي السلالة المعروف انها تحتوي علي توكسين ثنائي يسمى البيتا-اكسوتوكسين beta-exotoxin. من المؤكد ان البيتا-اكسوتوكسين سام للفقاريات مع جرعة نصفية قاتلة LD50 تساوي 13-18 ملليجرام لكل كيلوجرام من وزن الجسم (ملجم/كجم) في الجرذان عندما تحقن في البطن. لقد ادت جرعة فمية 200 ملجم/كجم يوميا الي الفئران بعد ثمانية ايام. البيتا-اكسوتوكسين تسبب تلف وراثي في خلايا الدم في الانسان. مستحضرات Bt التي تحتوي علي البيتا-اكسوتوكسين لم تستخدم في معظم الدول ولو انه جرت محاولات لتسجيل هذه المستحضرات في الولايات المتحدة الامريكية. هناك توكسين اخر ينتج بواسطة البكتريا هو الفا-اكسوتوكسين وهو شديد السمية الحادة علي الفئران. طرق الانتاج الحالية لبكتريا Bt تجعل من الفا-اكسوتوكسين غير ذات اهمية كمكون في مستحضرات Bt.

البكتريا المرتبطة Related bacteria: بكتريا Bt تنتمي الي مجموعة صغيرة من انواع البكتريا قريبة الارتباط ببعضها قبل B.cereus وهي بكتريا ترتبط بحدوث التسمم الغذائي B.anthraxis وهي بكتريا ممرضة بعنف في الحيوان مسببة مرض الجمرة الخبيثة anthrax. هذه الانواع الثلاثة من البكتريا شديدة الشبة ببعضها لدرجة وضع نظرية تقول بانهم اصناف Varieties لنفس النوع. اذا تم زراعة B.cereus مع خلايا Bt تنتقل المادة الوراثية الي خلايا السيريوس بما يسمح للسيريوس بانتاج بروتينات بلورات بكتريا Bt. انتقال المادة الوراثية بين Bt انثراكيس وبكتريا Bt حدث كذلك. التوكسين الناتج من بكتريا باسيليس سيريوس والتي تسبب اسهال في القرود تنتج كذلك بواسطة بعض سلالات Bt ولو ان هذا التوكسين لا يستحب وجودة في مستحضرات جراثيم Bt. لقد عاني المتطوعون من البشر من الغثيان والقئ والاسهال والام القولون وحمي بعد اكل طعام ملوث بواحد من سلالة Bt وكذلك باسيليس جاليري.

زيادة الحساسية **Increased susceptibility**: الناس الذين يعانون من مشاكل النظم المناعية او الحساسية المسبقة قد يكونوا ذوي حساسية خاصة لتأثيرات الباسيلليس Bt. في الجرذان التي تعاني من نقص وظائف جهاز المناعة كانت الجرعة النصفية القاتلة LD50 عن طريق الحقن تساوي قيمة اقل بمرات عديدة عن اعلي جرعة عوملت في الجرذان السليمة العادية. الجرذان ناقصي المناعة اظهرت نسبة موت اعلي من الجرذان العادية عندما حقنت بجرعة واحدة من Bti في تجويف البطن. مع هذا لم تسجل حالات مؤكدة نقيصة عن Bt سببت عدوي في الناس ناقصي المناعة. لذلك اوصي الاطباء بقسم الصحة العامة في ولاية اوريجون بضرورة مغادرة العاملين الذين يعانون من نقص المناعة الشديدة اماكن المعاملة والرش في الحملة الخاصة بمكافحة الحشرة ببكتريا Bt. لقد اشار صناع المستحضر Foray 48B ان كمية الرش التي يتعرض لها الفرد القائم او المشترك في حملة مكافحة بمستحضر المبيد البكتيري هذا قليل للغاية حتي يحدث حساسيات او التهابات جديدة. لقد اضاف اصحاب المستحضر انه من الممكن لاي فرد من هؤلاء الذين يعانون من الحساسية فعلا لواحد من مكونات Foray 48B ان يضر اي واحد من هؤلاء الذين يعانون من الغيبوبة ان يتاثر من جراء التعرض لكميات صغيرة من الفوراي 48-ب. اشارت استمارة بيانات امان الفوراي 48-ب الي ان تكرار التعرض عن طريق الاستنشاق يمكن ان يؤدي الي حساسية.

الملوثات او مسببات الاتساخ **CONTAMINANTS**: في منتصف الثمانينات كانت العديد من منتجات Bt ملوثة ببكتريا اخري مثل *streptococcus faecium* و *Sfaecalis*. بالرغم من ان مستحضرات ومنتجات Bt تتعرض للاستكشاف الروتيني للكشف عن تلوثات بكتيرية اخري الا ان خطر التلوث او الاتساخ ببكتريا مرضية اخري موجودة دائما. سوف اكتب هذه الجملة بالانجليزية حتي يقف مسئولو هذه الوسيلة الحيوية علي بعض جوانب الخطورة من التلوث:

"While Bt products are routinely monitored for bacterial contaminant, the risk of contamination with a disease-causing bacteria is always present"

المواد الخاملة Inert ingredients: كل منتجات Bt تحتوي مواد أخرى بخلاف البكتريا Bt لقد تم تعريف هذه المكونات بالمواد الخاملة وقد اعتبرت مواد ذات سرية خاصة من قبل صناع هذه المنتجات. لقد تأكد ان المواد الخاملة كما يطلقون عليها تمثل اكثر المكونات سمية في هذه المستحضرات البكتيرية. مثال ذلك انه خلال برنامج الرش لمكافحة الفراشة الفجرية في ولاية اوريجون عام ١٩٩٢ اتضح ان السيدة التي تعرضت للفوراي ٤٨-ب كان عندها حساسية مسبقة للمواد الكربوهيدراتية التي كانت موجودة في المادة الخاملة. خلال ٤٥ دقيقة من التعرض عانت من الم مبرح وظهور اعراض عصبية. بسبب النظرة للمواد الخاملة علي انها من اسرار التجارة الا انه توجد بعض المعلومات العامة عن تركيبها وتعريفاتها وهي قليلة. المعلومات المتاحة عن هذه المواد الخاملة انها تسبب مشاكل صحية. الفوراي ٤٨-ب يحتوي علي ايدروكسيد صوديوم وحمض كبريتيك وحمض فوسفوريك وميثيل بارابين وفوسفات بوتاسيوم كمواد خاملة. بالرغم من ان هذه المواد تمثل اقل من ١٠% من الفوراي ٤٨-ب فانها تسبب ضرر. ايدروكسيد الصوديوم والذي هو شائع بالاسم "Lye" يسبب تآكل شديد في العيون والجلد والاعشية المخاطية والجهاز الهضمي.... وغيرها. استنشاق غبار ايدروكسيد الصوديوم او الرزاز يؤدي في الحالات المعتدلة الي هياج وحساسية في الاعشية المخاطية للأنف وفي الحالات الشديدة يؤدي الي تلف القناة التنفسية. احمض الكبريتيك والفوسفوريك كلاهما يحدث تآكل. حمض الكبريتيك يمكن ان يحدث حروق عميقة في الجلد ويحدث ضياع كامل للرؤية. عند استنشاق ابخرة حامض الكبريتيك يسبب اختناق شديد في الشعب الهوائية والالتهاب الشعبي. حامض الفوسفوريك يهيج للجلد والاعشية المخاطية كما ان ابخرته تسبب الكحة وهياج في الحلق. لقد تم تسجيل مركبي البارابين وفوسفات البوتاسيوم من قبل وكالة حماية البيئة الامريكية علي انها مواد فعالة لمبيدات افات. لقد تم تعريف كبريتيت الصوديوم علي انه مادة خاملة في مستحضر Btk الديبيل 8AF. لقد اشارت احصائيات مرضي الربو في امريكا ان ١٠% من حالات الربو (حوالي مليون امريكي) يتفاعلون مع الكبريتيت SULFITES خاصة هؤلاء الناس الذين يعاملون بالاسنتيريودات. اعراض التعرض في هؤلاء الناس ذوي الحساسية للكبريتيت تشمل في العادة الجهاز التنفسي وقد تشمل كذلك الغثيان والاسهال ونقص ضغط الدم وطفح علي شكل بثور جلدية hives وصدمات عصبية وفقد الوعي.

السلوك او المال البيئي Environmental fate:

لا يعرف الا القليل عن الايكولوجيا الطبيعية لبكتريا Bt فهي توجد طبيعيا في العديد من الاراضي. ففي احدي الدراسات تم عزل Bt من ٧٠% من عينات التربة المأخوذة من مناطق متفرقة من العالم وكانت ذات وفرة اكثر في العينات التي جمعت من اسيا. اكثر من نصف العزلات لم توصف كاصناف باسيليس Bt. لقد تم عزل Bt كذلك من اجسام الحشرات واوراق النباتات والبيئات المائية كما انها وجدت في الورق.

• **التربة:** في العادة تظل بكتريا Bt ثابتة لفترة قصيرة فقط في الارض. لقد وجد ان نصف فترة الحياه الخاصة بالنشاط الابادي ضد الحشرات للبلورات حوالي ٩ ايام. هذا ولو ان كميات صغيرة قد تبقى لفترة معقولة. اظهرت احدي الدراسات ان اعداد جراثيم Bt تناقصت برتبة واحدة بعد اسبوعان ولكنها ظلت ثابتة لمدة ثمانية اشهر بعد المعاملة. لا يبدو ان بكتريا Bt تتحرك بسهولة في الارض في احدي الدراسات تم استخدام صنفين من Bt في قطعتان تجريبيتان متجاورتان ووجد عدم حدوث تلوث مشترك او عبوري بين القطعتين مما يوضح ان Bt لا تتحرك افقيا في التربة. اظهرت دراسة اخري ان Bt لم تسترجع من على عمق ٦ سنتيمترات بعد الري وان حركتها فيما بعد مكان المعاملة لم يتعدى ١٠ ياردات من المكان.

• **المجموع الخضري:** بكتريا Bt التي تستقر على السطح العلوي من الاوراق (المعرض لاشعة الشمس) قد تبقى فعالة لمدة ١-٢ يوم فقط ولكن البكتيريا Bt التي تستقر على الاسطح السفلي من الاوراق النباتية (محمية من ضوء الشمس) قد تبقى لمدة ٧-١٠ ايام. من الممكن ان تكون هذه البكتيريا اكثر ثباتا. لقد تم استرجاع Btk من المجموع الخضري لاشجار البيسية البيضاء بعد سنة من المعاملة. اظهرت احدي الدراسات في اليابان ثبات Bt لمدة سنتان في بساتين اشجار الموالح مع احتفاظها بالسمية على الديدان.

• **الماء:** لقد تم استرجاع Btk من الانهار والنظم العامة لتوزيع الماء بعد الرش الجوي لمستحضر الثوروسيد 16B. عمليات معالجة الماء القياسية ليست كافية لتحطيم جراثيم Btk. الجراثيم والبلورات ترتبطا بسهولة على الرواسب في عمود الماء مما يقلل من كفاءتها بجعلها غير ميسرة ليرقات البعوض والذباب الاسود. في احد الاختبارات تم اضافة Bti للماء ثم سمح لها بالتلامس مع جسيمات الطين. لقد وجد اكثر من ٩٩% من جراثيم Bti في الطين عما هو الحال مع الماء بعد ٤٥ دقيقة. لقد

احتفظت Bt بحيويتها وسميتها لحوالي ٢٢ يوم علي الأقل مسببة قتل ٩٠% من يرقات البعوض عندما رج الطين وتم ادخال الي الماء في العمود. في تجربة اخري تم استرجاع الخلايا الحية من الماء حتي ٢٠٠ يوم وفي الرواسب حتي ما يزيد عن ٢٧٠ يوم بعد المعاملة.

• الهواء: لقد وجد ان Btk يمكن ان تتجرف لما يزيد عن ٣٠٠٠ متر في اتجاه الرياح خلال الرش الجوي. تعتمد المسافة التي تتجرف اليها Btk علي كمية وطريقة المعاملة. وكذلك الظروف المناخية. لقد تم قياس الباسيلليس ثورينجنسيز في الهواء حتي ١٧ يوم من المعاملة.

التكنولوجيا الحيوية Biotechnology: من الامثلة الخاصة بالمناورة بالوسائل الوراثية genetic manipulation والهندسة الوراثية genetic engineering ما يلي:

١. في المنتج الزراعي Foil ثم نقل جين التوكسين الفعال ضد الخنافس خلال الارتباط conjugation (التكاثر الجنسي في البكتريا) الي خلية بكتريا Btk التي تؤثر فقط علي ابي دقيقات والفراشات. اظهرت الخلية الناتجة صفات ابادية ضد الحشرات الخنافس وابي دقيقات والفراشات. حيث ان وكالة حماية البيئة الامريكية EPA تعتبر الكائنات التي تنتج من الارتباط في اتجاه المناورة الوراثية عما هو الحال مع اتجاه الهندسة الوراثية. لقد سجل مستحضر Foil في امريكا عام ١٩٩٠.
٢. خلايا بسيدوموناس فلوريسينيس يمكن ان تهندس وراثيا لانتاج البيتا-اندوتوكسين دون انتاج الجراثيم. بروتين البللورة يظل داخل بكتريا البسيدوموناس في جدار الخلية. في منتجات MVP, M-Trak يتم قتل خلايا بسيدوموناس فلوريسينيس بعد ان تنتج بللورات البروتين. عندما يستخدم المركب فان الدلتا-اندوتوكسين تحتفظ بفعاليتها داخل جدار الخلية الميتة لفترة اطول مرتان او ثلاثة من مستحضرات Bt. لقد كانت MVP, M-Trak كانت من اوائل المنتجات المهندسة وراثيا التي سجلت من قبل الوكالة EPA حيث ان الكائن المهندس وراثيا transgenic لا يكون حيا عندما ينشر في البيئة.

٣. بكتريا Bti التي تستخدم في مكافحة يرقات البعوض والذباب الاسود التي تعيش علي سطح الماء تبدأ في الغوص بعيدا عن اليرقات المستهدفة خلال ٤ ساعة. البكتريا

التي تعيش طبيعيا علي سطح الماء (في نفس بيئة البعوض والذباب الاسود) تم هندسته وراثيا لانتاج بلورات روتينات Bti.

٤. لقد تم هندسة ما يزيد عن ٣٠ محصول مختلف لانتاج بلورات بروتين الباسيلليس Bt من خلايا التراكيب النباتية. أي افة تغذي علي أي جزء من هذه النباتات سوف تتعرض للدلتا-اندوتوكسين لبكتريا Bt وسوف تقتل الافراد الحساسة للتوكسين. من الواضح ان امكانيات الهندسة الوراثية للدلتا-اندوتوكسين لبكتريا Bt تبدو لا نهائية. مازال الباحثين علي معرفة ودراسة قليلة عن ايكولوجية والنبات الوراثي لبكتريا Bt لذلك فان التأثيرات الايكولوجية المؤثرة لهذه الكائنات المتحولة وراثيا يستحيل التنبؤ بها بشكل مؤكد.

المقاومة Resistance: لقد اعتقد العلماء في مرحلة من المراحل ان كيفية احداث الفعل في بكتريا الباسيلليس Bt معقدة بما فيه الكفاية بما يمنع تطور المقاومة في الحشرة. بعد ذلك اتضح مع الوقت ومن نتائج العديد من البحوث ان هذا الاعتقاد غير صحيح. لقد تم دراسة ٨ انواع من الحشرات بسبب قابليتها لتطوير المقاومة لبكتريا Bt. فراشة الدقيق الهندية وهي افة تصيب الحبوب المخزونة في اماكن كثيرة من العالم وقد كانت اول حشرة طورت مقاومة لبكتريا Btk في التجارب المعملية. لقد تطورت وتقدمت البكتريا بسرعة في التجارب المعملية عما هو الحال مع الظروف الحقلية بسبب الضغط الانتخابي العالي في المعمل. لم تظهر اية دلائل تشير الي تكون المقاومة ضد Bt في الحشرات في الحقل حتي لوحظت المقاومة في الفراشة ذات الظهر الماسي في الزراعات التي تم فيها تكرار استخدام الباسيلليس Bt. منذ ذلك الحين لوحظت المقاومة في المعمل في دودة براعم الدخان وخنفساء كلورادو الببطاطس وغيرها من الانواع الحشرية. اظهرت الفراشة الفجرية ميل كبير لتطور المقاومة لبكتريا Bt. لبعض الحشرات مثل الفراشة ذات الظهر الماسي ودودة براعم الدخان اظهرت مقاومة لسلاسل عديدة من الباسيلليس. لقد حدث ويحدث تطور سريع تجاه المقاومة عندما استخدمت او تستخدم كميات كبيرة من المبيد ، لذلك فان استخدام النباتات الحقلية المهندسة وراثيا لانتاج توكسين Bt سوف يزيد من عدد الحشرات المقاومة للباسيلليس.

التأثيرات الايكولوجية لبكتريا Bt: Ecological impacts

بعض اهم النواحي الاكثر خطورة في طريق الاستخدام العريض للباسبيليس كوسيلة لمكافحة الافات جاءت من التأثيرات التي قد تحدثها علي الحيوانات بخلاف الافة المستهدف مكافحتها. كل منتجات الباسبيليس Bt تستطيع قتل الكائنات الاخرى غير المستهدفة. من ناحية اخرى فان الحيوانات التي تعتمد علي هذه الكائنات الحية للتغذية يمكن ان تتأثر كذلك.

**** الحشرات النافعة:** العديد من الحشرات ليست افات كما ان أي برنامج او أسلوب لإدارة التعامل مع الافات يحتاج لاهتمامات خاصة تحافظ علي كل ما يطلق عليه الكائنات او الاحياء النافعة مثل الحشرات التي تتغذي او تفترس الافات الحشرية. لقد وجد ان بكتريا Bt ذات تأثيرات ضارة علي الانواع النافعة. مثال ذلك ما توصلت اليه الدراسات علي الدبابير التي تتطفل علي فراشة الحبوب "بلوديا انتر بنكتلا" من ان المعاملة ببكتريا Bt تقلل من عدد البيض الذي ينتجة الدبور وكذلك نسبة الفقس في البيض الموضوع. انتاج وفقس البيض في البق المفترس تناقص كذلك. لقد حدث نقص في اعداد الذباب الاكل للمن من جراء المعاملة بمستحضر الديبيل. لقد احدث كلا Bt تينبيريونيس والديبيل موت للاكاروسات المفترسة. لقد احدث الديبيل كذلك موت لفراشة السينابار. التي تستخدم في مكافحة الحيوية لحشيشة تاليسي راجورت. كذلك وجد ان Bti تسبب الموت في فراشة *synclita oblitalis* التي تقضي علي الحشائش المائية في فلوريدا

**** حشرات اخرى:** العديد من الحشرات التي ليس لها منفعة مباشرة في الزراعة تكون ذات اهمية في وظيفة وتركيب النظم البيئية. لقد اوضحت العديد من الدراسات ان تطبيقات Bt قد تحدث خلل في مجتمعات الحشرات. لقد اوضحت البحوث بعد التطبيقات الواسعة لبكتريا Bt لقتل يرقات الفراشة الفجرية في مقاطعة لين بولاية او ريجون. ان عدد الانواع التي تستغذي علي يرقات البلوط نقصت علي مدي ثلاث سنوات بعد الرش. حدث نفس النقص في اليرقات التي تتغذي علي فروع الدخان بعد استخدام Btk لمكافحة دودة البراجم في اوريجون. في المناطق غير المعاملة كانت عدد الانواع النافعة اعلي بمقدار ٣٠% واليرقات زادت بمقدار ٥٠% عما هو الحال في المساحات المعالجة ببكتريا Btk بعد اسبوعين من المعاملة واستمر نقص اليرقات في المناطق المرشوشة في الصيف التالي. لقد تأثرت الحشرات المائية كذلك من جراء المعاملة ببكتريا Bt. لقد اظهرت الدراسات في كندا ان بعض الحشرات في النباتات المائية (سيموليوم فيتاثم....) قتلت بواسطة استخدام

مستحضرات الثوروسيد والديبيل. لوحظ ان العديد من انواع الهاموش قتلت بسبب الاستخدام المتكرر لمستحضرات بكتريا الباسيلليس ثورينجنسيز الاسرائيلية.

**** الطيور:** حيث ان العديد من الطيور التي تتغذى علي الديدان وغيرها من الحشرات تتأثر وتضار ببكتريا Bt لذلك لا يكون مستغربا حدوث تأثيرات ضارة علي الطيور. لقد تم توثيق هذه الاضرار ففي ولاية اوريجون كمثال وجد ان الطيور التي توجد اعشاشها في المناطق المعاملة ببكتريا Bt تحضر اعداد قليلة من الديدان للعشوش بالمقارنة بنفس الطيور في المناطق غير المعاملة ببكتريا الباسيلليس. الطيور عندها مقدرة لايجاد اطعمه اخري ومن ثم لا تحدث اضرار علي نجاح العشوش. في نيوهامشاير وعندما ادت المعاملة ببكتريا الباسيلليس الي خفض تعداد الديدان قلت محاولات الطائر الازرق ذو الحلق الاسود في اقامة العشوش كما كانت الديدان التي يحضرها للصغار قليلة. هناك بعض الادلة ان بكتريا Bt تحدث تأثيرات سامة مباشرة علي الطيور. لقد اظهرت تجارب الديبيل حدوث خفض بمقدار ٥٠% في فقس بيض المعاملة بالديبيل. حيث ان الديبيل يستخدم مع المادة الناشرة/اللاصقة بليك plyac فان نقص فقس البيض قد يرجع الي البليك وليس للبكتريا Bt نفسها.

**** حيوانات اخري:** حيث ان حيوان الذبابة shrews يتغذى في الغالب علي الديدان الحشرية فان حدوث ضرر من جراء استخدام ومعاملات Bt واردة ومستحبة. اظهرت احد الدراسات في شمال كندا (اونتاريو) ان المعاملة بمستحضر الديبيل غيرت من تركيب مجموع حيوان الذباب لقد حدثت هجرة للذكور البالغة مما ادي الي زيادة نسبة الصغار الي الشباب. لقد حدث تحول في تغذية الشباب. لقد حدث تحول في تغذية الشباب والاناث البالغة الي اطعمة بديلة عن ديدان الحشرات. اتضح ان مستحضر Foray 48B عندما يستخدم بتركيز عالي (حوالي ٣%) تحدث سمية حادة لاسماك السلمون وربما يكون ذلك بسبب الحموضة العالية للمنتج. معاملات Bt قد تؤثر كذلك علي حيوانات اخري فقد ثبت ان التركيزات الواطية من اندوتوكسينات Bti تحدث نقص في وزن فراخ الضفادع كما تؤخر من تطورها. مستحضر Bti المسمى فيكتوباك ذات سمية حادة علي اسماك المينوه وقد يرجع ذلك الي الشوائب الموجودة في المستحضر والتي تسبب نقص الاكسجين المذاب في الماء. مستحضر Bti المسمى "تكنار" يحدث سمية حادة علي اسماك السلمون بسبب الزيلين المستخدم كمادة خاملة في المستحضر

مقارنة المبيدات الحشرية المخلقة: حيثما اجريت مقارنة يتضح ان الاضرار الايكولوجية لمعاملة بكتريا Bt غالبا اقل من المبيدات الحشرية التقليدية المخلقة (مثل الكارباريل الذي يقتل العديد من المفترسات).

بروتوكولات تقييم فعالية المبيدات الحيوية

تجدر الإشارة الى ان المبيدات الحيوية ابطاً عادة في تأثيرها عن المبيدات الكيميائية ولذلك قد يلزم تكرار الاستخدام علي فترات متقاربة، وفي كافة الاحوال يجب تسجيل تعداد الافة ومستوي الاصابة موضع الدراسة قبل بدء استخدام المبيد الحيوي مباشرة وعلي فترات دورية قبل كل معاملة ثم بعد فترات بعد اخر استخدام للمبيد الحيوي. ويقوم الفعل النهائي للمبيد الحيوي علي اساس تعداد الافة بعد اخر استخدام للمبيد الحيوي وعلاقته بتعداد الافة ومستوي الاصابة قبل بدء الاستخدام. ويراعي تسجيل كافة الملاحظات والبيانات العلمية عن تأثير هذه المبيدات الحيوية علي الكائنات الاخرى غير المستهدفة خاصة عناصر مكافحة الحيوية المتواجدة في المساحة التجريبية والحشرات النافعة.

ويراعي توافر الشروط التالية في المبيد الحيوي الذي يجرب تحت الظروف المصرية:

١. يجب ذكر كافة المعلومات عن المبيد الحيوي متضمنة الكائن الفعال والسلالة - ان وجدت - والنوع والجنس ومكان عزلة والتوثيق العلمي لتعريفه ومستندات التوثيق والجرعة ومدة الصلاحية وشروط التخزين ونظام الاستخدام وكيفية التقدير في النظم المختلفة. وفي حالة وجود خليط من العزلات يجب ذكر بيانات كل سلالة علي حدة والتأكد من ان كل سلالة تتطبق عليها كافة الشروط السابقة.
 ٢. يكون المبيد واضح التخير ولا يكون له سلالات ممرضة لكائنات اقتصادية ونافعة في الوسط البيئي مثل النباتات الاقتصادية - عناصر مكافحة الحيوية - الحشرات والحيوانات النافعة - الكائنات الدقيقة النافعة للتربة ولا يحتوي علي كائنات دقيقة اخرى ممرضة وضارة للنظم البيئية.
 ٣. ان يكون مستحضر المبيد الحيوي خالي من أي مواد سامة مضافة او اية كيماويات ضارة بيئياً - مثل المبيدات بانواعها او منظمات ومنشطات النمو للكائنات الحية.
 ٤. لا يفرز سموماً جهازية تتسرب الي غذاء الانسان او الحيوان من خلال النباتات المعاملة.
 ٥. يسهل تنمية الكائن الحي الفعال للمبيد الحيوي علي بيئات متوافرة غير مكلفة.
 ٦. نظراً لاختلاف سلوك الكائنات الحية في النظم البيئية المختلفة فانه يجب قبل بدء التجريب الحقل للمبيد الحيوي في مصر فانه يجب اجراء التجارب تحت ظروف المعمل او الصوبة او الحقل المحدود بالجهات البحثية المتخصصة لتقييم ما يلي:
- أ. القدرة الممرضة للمبيد الحيوي علي النباتات الاقتصادية في الوسط البيئي.

ب. القدرة الممرضة للمبيد الحيوي على عناصر المكافحة الحيوية (المتطفلات - المفترسات).

ج. القدرة الممرضة للمبيد الحيوي على الحشرات النافعة (مثل نحل العسل - دودة الأرض - الثديسيات). إضافة الي ذلك يتم دراسة التأثير على الكائنات الدقيقة النافعة في التربة.

يتم التوصية بالمبيد الحيوي بعد اجتيازة لمراحل الاختبار طبقا للبروتوكول الخاص بالافه المستهدفة.

الباب الثامن
النباتات المهندسة وراثيا بحينات توكسينات
بكتريا الباسيليس ثورينجنسيس BT (التقدم والمنظور)

النباتات المهندسة وراثيا بجينات توكسينات بكتريا الباسيلليس ثورينجنسيس Bt (التقدم والمنظور)

مقدمة: منذ أربعين عاما ارتبط المفهوم العام للمكافحة البيولوجية للآفات باستعمال الأعداء الطبيعية من طفيليات ومفترسات ومسببات أمراض للسيطرة على مجاميع الآفات. قد تقيد الجانب الأكبر من ممارسات تلك المكافحة الكلاسيكية باستيراد وتوطين هذه الوسائل. غير ان المكافحة البيولوجية اتخذت في السنوات الأخيرة معنى أكثر شمولية حيث أدمجت العناصر البيولوجية التقليدية باتجاهات جديدة تتضمن منظمات النمو الحشرية، الجاذبات، المعقمات، الاستخدام المتقن للفورمونات الجنسية الجاذبة أو التي تحدث تشويش في التزاوج ومقاومة النبات للإصابات بالآفات الحشرية وغيرها.

في مجال مكافحة الآفات الزراعية، تشكل مسببات الأمراض أهم بديل للمبيدات الكيميائية التقليدية حيث تعمل مستحضراتها عند التطبيق بوسيلة تماثل وسيلة المبيدات الكيميائية للسيطرة على الآفات على النبات القائم بالحقل. كما تستخدم بالتوافق مع المبيدات الأخرى، وغيرها من الإجراءات الأخرى للمكافحة، كجانب من الإدارة المتكاملة للآفات. في هذا المجال قد تؤدي هذه الوسائل دورا فعالا في مكافحة سلالات الحشرات المقاومة للمبيدات، وقد تتغلب مبكرة على ظهور صفة المقاومة في الآفة. لدفع المبيدات الميكروبية في السوق التجاري، تبذل حاليا جهودات من قبل مؤسسات علمية وتجارية للتغلب على سلبيات هذه المركبات بسبب تدهورها السريع، وعدم دوام تأثيرها بالحقل، وإنتاجها المكلف. يبدو ان النجاح قريب بسبب تقدم علم البيولوجيا الجزيئية، والإمكانيات من علم التكنولوجيا الحيوية. كما فتح علم الهندسة الوراثية آفاقا جديدة في المجال. هناك محاولات لعزل الجينات المسؤولة عن تكوين البلورات السامة للبكتريا الممرضة للحشرات Bt وزرعها في أنسجة بعض النباتات ذات الأهمية الاقتصادية، والتي تتعرض لآفات حساسة لهذا النوع البكتيري. فقد نقلت الجينات أولا الى نوع بكتيري آخر يتبع جنس اجرو بكتيريوم ذي القدرة على غزو أنسجة النبات لتوصيل الجينات المراد نقلها الى أنسجة النبات. تتم هذه الخطوة باستخدام مزارع الأنسجة حيث يجري بعد ذلك تنمية النبات المهندس وراثيا، والذي سوف تكون لخلاياه القدرة عندئذ على إنتاج البلورات السامة، وبذلك تصبح أنسجة النبات المهندس وراثيا ذاتها سامة للحشرة إذا ما تغذت عليها. كانت التجارب الأولى على هذا الأسلوب قد نجحت على نباتات التبغ في أمريكا بهدف مكافحة دودة براعم التبغ.

غير ان هناك نقاط عديدة تنتظر التوضيح مثل قدرة النباتات المنتجة وراثيا على الحفاظ على صفة المقاومة ضد الآفة من جيل الى جيل، وما إذا كانت الحشرة نفسها سوف تكتسب مقاومة ضد فعل البلورات السامة عند تغذيتها جيلا بعد جيل على هذه النباتات وكذلك الأمان الصحي والبيئي لهذه النباتات المقاومة الواعدة.

البكتيريا المتجرثة الثورينجينية (*Bacillus thuringiensis* (B.t.)

فى حالة البكتريا المتجرثة الثورينجينية تتحرر الجرثومة والجسم البلوري من الجدار الجرثومي اثر ذوبانه بالعصير الخلوي لمعدة العائل. كذلك يذوب الجسم البلوري بدوره بفعل الأنزيمات المحللة للبروتين. تنشأ القدرة المرضية للبكتريا B.t. من إفراز أربعة مركبات سامة تتواجد فى خلاياها، أو فى وسط تكاثرها هي:-

١- أنزيم الفوسفوليبيز (Phospholipase C = Lecithinase C) المسئول عن اهلاك

العائل، ويشار الى هذا الأنزيم بالالفا اكسوتوكسين (B.t.α-exotoxin).

٢- المركب السام الثانى يسمى بالبيتا اكسوتوكسين (B.t.β-exotoxin) وقد عزل من

مزارع هذا النوع البكتيري ويتركب من أجزاء متساوية من الادينين والريبوز

والفوسفور ويوقف تخليق الحمض النووي RNA.

٣- الجاما اكسوتوكسين (B.t.γ-exotoxin) هذا المركب لم يثبت سميته بصفة قاطعة.

٤- المركب السام الرابع المعروف بالدلتا اندوتوكسين (B.t.δ-exotoxin) يتواجد بداخل

الجسم السبلوري للخلية البكتيرية. يتحمل هذا المركب درجة الحرارة، ويذوب فى

المحاليل القوية. ينشط هذا الاندوتوكسين فى القنوات الهضمية ذات الوسط القلوي

مطلقا المكونات السامة من الجسم البلوري مما يتسبب فى شلل القناة الهضمية فى

مدى دقائق من تواجدها فى الجسم. يتبع ذلك تساقط خلايا معدة العائل المتفككة فى

فراغ المعدة مما يعرض غشاءها القاعدي المتهتك لهجمات الخلايا البكتيرية

الخطيرة واختراقها له ووصولها الى دم العائل.

كما ذكر سابقا بان هناك محاولات تمت واخري مازالت جارية لعزل الجينات

(ICP genes) المسئولة عن تكوين البلورات السامة (ICPs) Insecticidal crystal

proteins للبكتيريا الممرضة للحشرات B.t. وزرعها فى أنسجة بعض النباتات ذات

الأهمية الاقتصادية، والتي تتعرض لآفات تصاب بهذا النوع البكتيري حيث يتم نقل

الجينات أولا الى نوع بكتيري اخر يتبع جنس *Agrobacterium* ذي القدرة على غزو

أنسجة النبات وهو فى هذه الحالة يعمل كحامل لتوصيل ال ICP genes الى أنسجة

النبات. ومن ثم تصبح هذه النباتات المهندسة وراثيا لها القدرة على إنتاج البللورات السامة (ICP) وبالتالي تصبح أنسجة هذه النباتات سامة للحشرة إذا ما تغذت عليها.

الهندسة الوراثية والتكنولوجيا الحيوية النباتية فتحت العديد من الفرص لتحسين النباتات بتقديم حلول جديدة للمشاكل المستعصية منذ زمن بعيد. من أكبر العوامل الكبرى غير الثابتة التي تؤثر على إنتاجية المحاصيل تلك التي تعنى بالإصابة بالحشرات. فقد الشامل العالمي من الآفات الحشرية يصل لحوالي ٢٠ - ٣٠% من جملة الإنتاج الزراعي بالرغم من استخدام وسائل حماية النباتات التي تشمل المبيدات الحشرية الفعالة (James وآخرون، ١٩٩١). لقد أدى الاستخدام المكثف للمبيدات الى ظهور مشاكل خطيرة من جراء الانهيار البيئي وصحة الإنسان . الهندسة الوراثية للنباتات لتحقيق المقاومة للحشرات تمثل فرصة جذابة لتقليل الضرر الذي تحدثه الحشرات ومن ثم تقلل من استخدام مبيدات الآفات (Kumar and Sharma، ١٩٩٤). جزئيات المبيدات الحشرية الفعالة يمكن أن توجد في كائنات حية متنوعة والتي إذا أنتجت بتركيز فعال في النباتات يمكن أن تحدث مقاومة للحشرات. في الحقبة الزمنية الأخيرة تم تحقيق نجاح مشهود في تطوير النباتات المقاومة للحشرات مما أدى الى بداية التسويق التجاري للنباتات المهندسة وراثيا عام ١٩٩٦ (Krattiger، ١٩٩٧). لقد تم اختبار مجموعة من الجينات المشفرة لأقسام مختلفة من البروتينات ذات التأثيرات كمبيدات حشرية مثل مثبطات البروتياز والليكتينات ومثبطات الأميليز وتوكسينات فينوم العقرب وأنزيمات التخليق الحيوي للسيتوكيبتينات والكوليسترول أكسيديز والكتيبيز والجاما إندوتوكسينات للباسبيليس ثورينجيسيز (Bt) في مكافحة الحشرات. من بين هذه البروتينات ما يختص بالبروتينات البلورية التي تبديد الحشرات من بكتريا Bt والتي أظهرت اقتدار وكفاءة عالية بسبب كفاءتها والتخصص على الحشرات ونقص النشاط في الثدييات وغيرها من الكائنات الحية. في هذا المقام سوف نتناقص التقدم الحديث الذي تحقق في تطوير النباتات المحورة وراثيا باستخدام جينات Bt .

A.D. Mandaokar , P. Anand Kumar , V.S. Malik and R.P.Sharma**
National Research Center on Plant Biotechnology , Indian
Agricultural Research Institute , New Delhi 110012 , India
**APHIS United States Department of Agriculture , 4700 River Road ,*
Riverdale , MD 20737 , USDA .

الفصل الأول

أساسيات الحصول على النباتات المهندسة وراثيا

بجينات توكسينات بكتريا Bt

البروتينات القاتلة للحشرات في بكتريا الباسيلليس ثورينجينسيس

بكتريا الباسيلليس ثورينجينسيس عبارة عن بكتريا تسكن التربة موجبة لجرام وهي تتسج بلورات داخلية عند التجرثم. في بدايات القرن العشرين وجد أن هذه البكتريا لها تأثيرات إيادية على الحشرات (Berliner, 1915). بعد سنوات تم الكشف عن أن نشاطها وفعلها على الحشرات يرجع إلى بروتينات موجودة في البلورات وقد أطلق عليها بروتينات بلورية كمبيدات (ICPs) "insecticidal crystal proteins". منذ ذلك الوقت استخدمت سلالات Bt والجراثيم والبلورات و ICPs كمبيدات حشرية حيوية في مستحضرات تجارية. التخصصية والأمان البيئي لمبيدات الحشرات Bt حفزت البحوث لسلالات Bt جديدة تنتج توكسينات ضد آفات حشرية أكثر. سلالات مبيدات Bt فعالة ضد حشرات حرشفية الأجنحة وغمدية وثنائية الأجنحة (Hofte and Whiteley, 1989). بالرغم من التجانس الكبير الذي وجد بين الجينات التي تشفر مختلف البروتينات السامة TCPs لقسم خاص من الحشرات فإن الحساسية في حشرات خاصة لنواتج جين Bt قريب في الغالب تكون مختلفة جدا (Van Frankenhuisen, 1992). بلورات مبيدات Bt (Cry) البروتينية تم تقسيمها إلى 17 عائلة (جدول 8-1) بناء على تركيب الحمض الأميني (Crickmore وآخرون، 1995). جينات البكتريا Bt والتي شفرت لبروتينات بلورات المبيدات ICPs أوضحت تجانس قوى في بعض الأوساط المحفوظة (Bravo, 1997). جينات مبيدات Bt هذه توجد غالبا على بلازميدات مرتبطة كبيرة وهذا قد يفسر حركتها الملحوظة بين سلالات البكتريا Bt. سلالة واحدة يمكن أن تحتوى على العديد من جينات Cry ونفس الجين يمكن أن يوجد في سلالات عديدة. العديد من ICPs كانت حوالى 130 Kda في الوزن الجزيئي وتجهز في المعى الأوسط لصور فعالة ونشطة للتوكسينات حوالى 65 - 75 Kda من خلال نهايات -N في البروتينات. تحدث هذه التوكسينات سميتها من خلال الارتباط بالخلايا الطلائية للمعى الأوسط ومن ثم تحدث تحلل في الأسموزية خلال تكوين الثقب في غشاء الخلية (Gill وآخرون، 1992).

لقد لوحظ حديثاً أن السوائل الرائقة في المزارع الرائقة التي تجمع خلال النمو الخضرى لأنواع الباسيلليس غنية في جزيئات المبيدات الحشرية (Warren وآخرون ١٩٩٦، Estruch وآخرون، ١٩٩٦). السوائل الرائقة لبعض عزلات *B.cereus* تملك سمية عالية ضد ديدان جذور الذرة المعروف عنها مقاومتها للبروتينات ICPs. صفات الإبادة ضد الحشرات ترتبط بنظام مزدوج يطلق على نوعى البروتينين Vip1 , Vip2 (بروتين خضرى للمبيد). على نفس المنوال فإن السائل الرائق لبعض مزارع بكتريا *Bt* له صفات ابادية عالية ضد الحشرات مثل الدودة القارضة والحفارات (Estruch وآخرون، ١٩٩٦). لقد أظهرت كلونة وتوصيف الجين بروتين جديد كمبيد حشرى وهو Vip3A وهو غير متجانس مع أى بروتين معروف. التابع الطرفي للنتروجين N-terminal لبروتينات Vip تملك عدد من البقايا المشحونة موجبا متبوعة بمنطقة ثقب كاره للماء وهو مشابه لأية إشارات ببتيدية وصفت لبكتريا باسيلليس (Estruch وآخرون، ١٩٩٦). Vips خاص Vip3A تحدث نشاط ابادى ضد الحشرات خاصة حشرقيات الأجنحة. لقد أوضحت دراسات المرضية التشريحية للحشرات الحساسة التي تغذت على غذاء مضاف إليه Vip3A حدوث شلل في الأمعاء يتبعه تحلل كامل للخلايا الطلائية في الأمعاء مما يؤدي الى موت البرقات (Yu وآخرون، ١٩٩٧). لقد لوحظ انهيار كامل للخلايا الطلائية العمادية.

جدول (٨-١) : المجاميع الأولية للاندوتوكسينات في الباسيلليس
ورينجنيسز وتخصصها الالابدى ضد الحشرات

| البروتين | التخصص | البروتين | التخصص | البروتين | التخصص |
|------------------|-------------|--------------|-------------|----------|-------------|
| ICP | Specificity | ICP | Specificity | ICP | Specificity |
| CryIA(a,b,c,d,e) | L | Cry2A(a,b,c) | L,D | Cry9Aa | L |
| CryIBa | L,C | Cry3A | C | Cry9Ba | L |
| CryIC(a,b) | L,C | Cry3B(a,b) | C | Cry9Ca | L |
| CryID(a,b) | L | Cry3Ca | C | Cry10Aa | D |
| CryIE(a,b) | L | Cry4Aa | D | Cry11Aa | D |
| CryIFa | L | Cry4Ab | D | Cry12Aa | N |
| CryIGa | L | Cry5A(a,b) | N | Cry13Aa | N |
| CryIHa | L | Cry6A | - | Cry14Aa | C |
| CryII(a,b) | L,C | Cry7A(a,b) | C | Cry15Aa | - |
| CryIJa | L | Cry8Aa | C | Cry17Aa | - |
| | | Cry8Aa | C | Cry17Aa | - |
| | | Cry8Ca | C | | |

نيماتودا ، غمدية الأجنحة ، ثنائية الأجنحة ، حشرية الأجنحة

إدخال الجينات المسؤولة عن تكوين البلورات السامة (ICP genes) داخل النباتات: في أول الأمر أثبتت النباتات ان قابليتها للتعديل الوراثي أقل كثيرا من الميكروبات. على ان هناك الآن عدة طرق متاحة لذلك، أكثرها استخداما يتأسس على بكتريا اجروباكتيريام تيوميفاسينس *Agrobacterium tumifaciens* وهي نوع من البكتيريا بسبب أوراما على كثير من النباتات الزهرية تسمى التدرن التاجي. هذه البكتريا تحوي بلازميد يطلق عليه الورم (م و) وهو يسمى هكذا لانه عندما ينقل الى كروموزومات نبات يحدث فيه العدوي ومن ثم يصبح نمو النبات نموا مختلا. لقد حرص علماء الوراثة على تعديل بلازميد محدث الأورام (م و) لهذه البكتريا لخدمة أهدافهم الخاصة. فهم يزيلون من البلازميد جيناته المحدثة للورم ودمجون بدلا منها جينات البلورات السامة (ICP genes) التي تؤخذ من بكتيريا *B. thuringiensis*، وبهذا فانهم يستخدمون البلازميد كناقل يولجون معه داخل النباتات العديدة من الجينات الجديدة المرغوبة لتحقيق المقاومة النباتية ضد الآفة أو عامل الإجهاد تحت التناول.

أحد الملامح الرئيسية لتحويل النباتات وراثيا هي نباتات بأكملها من خلية واحدة. فمثلا فان خلية واحدة من ساق نبات التبغ يمكن استنباتها لتجديد إنماء النبات كله. هذه العملية من التكاثر الخضري (زراعة الأنسجة) هي ما يمكن تشبيهه ببستاني قد اخذ شتله من أحد الأنواع المرغوبة. على ان عالم الوراثة يستطيع إدخال جينات الى هذه الخلايا ثم يسمح للخلايا بالتكاثر ثم ينتج الآلاف من النباتات المحورة وراثيا.

لقد تمكن كثير من العلماء باستخدام بكتيريا *A.thumifaciens* من إنتاج بعض النباتات المحتوية على *ICP genes*. من هذه النباتات القطن، الطماطم، البطاطس، البرسيم والذرة والتي أصبحت تزرع على نطاق واسع في بعض البلدان مثل الولايات المتحدة الأمريكية.

هناك طرقا أخرى لوضع جينات جديدة داخل النباتات غير استخدام ال *A. tumifaciens* مثل: الإدخال المباشر لل DNA في بروتوبلاستات عارية اي في خلايا نباتية بنقصها جدارها الخارجي المتين، الذي يمكن ازالته بهضمه باستخدام الأنزيمات. هناك عملية من التنقيب الكهربى، يتم فيها امرار تيار كهربى نابض خلال خليط من ال DNA ومن البروتوبلاست. ويفتح التيار الكهربى ثقوبا دقيقة في الخلايا تسمح بدخول ال DNA الذي يمكن ادماجه بعدها في النواة. رغم ان البروتوبلاستات هشة الا ان جدار الخلية قد ينمو مرة ثانية خلال يوم أو ما يقرب ويمكن بعدها استنبات الخلايا المعدلة لتنتج نباتات بأكملها تحمل الجينات المنقولة.

النباتات المهندسة وراثيا ببكتريا الباسيلليس *Bt-transgenic plants*

في أكثر النظم الفعالة التي نشرت ونزلت للأسواق النباتات المهندسة وراثيا ببكتريا الباسيلليس ثورينجينسيس *Bt*. النظم الأخرى مثل البكتريا *Bt* المحورة وراثيا، الكائنات الدقيقة المحورة، الفيروسات المتحولة *Bt* وكذلك مستحضرات *Bt* تعاني من العديد من العيوب الوراثية (Kumar وآخرون، ١٩٩٦). التطورات الحديثة في تكنولوجيا تحول النباتات أدت الى مساعدة الإدخال الثابت للجينات الغريبة في العديد من أنواع المحاصيل الهامة بما فيها ذات الفلقة الواحدة (Dale وآخرون، ١٩٩٣). لقد نشر أنه تم تحويل أكثر من ٧٠ نوع نباتى هامة من خلال الهندسة الوراثية. لقد تأكد عندئذ من الاقتدار العالى للهندسة الوراثية للنباتات بما يمكنها من التعبير عن جينات *Bt* المزروعة. المميزات الهامة لصفة مقاومة الحشرات التى هندست فى النباتات تشمل:

١. تحقيق حماية طوال الموسم بصرف النظر عن الظروف الجوية.
 ٢. مكافحة فعالة ضد الحشرات المدفونة والمختبئة والتي يصعب الوصول اليها بالرش.
 ٣. مكافحة كل أطوار الحشرة.
 ٤. الحشرات التي تاكل النباتات هي فقط التي تتعرض للتوكسينات. إحداث المقاومة النباتية ذات مردود اقتصادي لأنها تقلل عناصر التكاليف التي يتحملها الفلاح.
- المحاولة الأولى للتعبير بالجاما - اندوتوكسينات في النباتات استخدمت التقابح الأصلية المشفرة من بكتريا الباسيليس Bt. لقد استخدم الباحث Vaeck ومعاونوه (١٩٨٧) محفز المانوبايين سينسيز و ٣ منطقة الأدينالين المتعدد لجين T-DNA-7 للتعبير عن جين CryI Ab S-endotoxin. التراكيب التي فحصت في الدخان شملت الشرائح الطرفية NH₂- التي تشفر ٦٠ حامض أميني وتركيبين يشفرا انطلاق الترجمة بين شرائح نهايات ن^٢يد للكراي 1Ab وجين npt II. مستويات الجاما - اندوتوكسين التي تم التعبير عنها في النباتات المحسوبة على البروتينات العارية أو بروتينات الانتشار تتراوح من ٢,٦-١٩٠ نانوجرام كريل Ab1/ملجم بروتين ذائب أو ٠,٠٠٠٢ - ٠,٠٢% من البروتين الكلي الذائب. لقد قام Barton وآخرون بتحليل التعبير الخاص بجين الكريل A1 الأصلي في الدخان باستخدام الجين كامل الطول والجين عديم الأثرع المشفر لبروتين الحمض الأميني ٦٦٤. كلا الاقترابان استخدمتا المنشط CaMv35S , UTL - 5 لفيروس موزايك البرسيم RNA ومنطقة النوبالين سينسيز عديدة الأدينالية. لم يوجد نبات واحد من تلك التي حولت وراثيا بالجين كامل الطول ينتج مستوى يمكن الكشف عنه من بروتين Bt. تحليل بلوتات نورثرن لهذه النباتات أوضح وجود أنواع mRNA أقصر من النسخ من الجين كامل الطول مع شرائح أقصر مميزة وجود mRNA غير الكاملة في النباتات المتحولة وراثيا ترجع الى عدم كفاية عمليات ما بعد الاستنساخ أو العودة السريعة للنسخ كامل الطول.
- لقد قام Fischhoff وآخرون (١٩٨٧) بتحويل الطماطم مع جين كريل Ab1 الأصلي. لقد استخدم طرازان عديمي الأثرع من الجين واحد يشفر بروتين ٤٦٤ حمض اميني والآخر بروتين ٧٢٥ حمض اميني. كل طراز اشتق من او بواسطة محفز CaMV35S و٣- عديد الأدينالية كمنطقة من جين النوبالين سينسيز. التعبير عن شريحة NU2 الطفرة فقط لجين الجاما - اندوتوكسين انتج نباتات ذات نشاط ابادي على الحشرات. كذلك أدى إدخال الكريل Ab - nptII في نباتات البطاطس الى تحقيق نشاط ابادي قليل ضد الحشرات (cheng وآخرون، ١٩٩٢). لقد تم إدخال جين نشيط كريل III يبدأ من

الحمض الأميني ٤٨ في نباتات الطماطم والبطاطس . لقد كانت مستويات التعبير في هذه النباتات قليلة جداً أى أقل من ٠,٠٠١% من البروتين الذائب الكلى. لقد أوضحت الدراسات التى أجريت على نباتات الطماطم والبطاطس المتحولة وراثياً مع نهايات NH₂ لجين Bt كريل 1 Ab أن نباتات الطماطم المتحولة أنتجت حوالى ٥٠ نانوجرام كريل 1 Ab لكل جرام من نسيج الورقة (Fischhoff وآخرون، ١٩٨٧). بينما أنتجت نباتات البطاطس ٩٠-١٥٠ نانوجرام كريل 1Ab لكل جرام من نسيج الورقة (Peferoen، ١٩٩٢).

التعبير عن جين الاندوتوكسين الأصلي كريل 1Ab فى الدخان النامى فى الحقل تم توصيفه بواسطة Carozzi وآخرون، ١٩٩٢. لقد تم دراسة ستة خطوط دخان مهندسة وراثياً تعبر عن الحمض الأميني ٦٤٥ فى بروتين Ab Cry7 من الجين الأصلي عديم الأثرع تحت سيطرة المحفز CaMV 35 S ومع تتابعات ٣-عديدي الأدينالية. لقد زادت مستويات الجاما - اندوتوكسين خلال التطور النباتى مع زيادة محسوسة عند الأزهار. مستويات الكراى 1 Ab عند الأزهار تراوحت من ٤٠٠ - ١٠٠٠ نانوجرام لكل جرام وزن جاف أو حتى ٠,٠١% من البروتين الذائب الكلى. الحمض النووى mRNA لاندوتوكسين Bt ذات الحجم المتوقع تم الكشف عنه بسهولة ولكن كان هناك RNAs متميزة عديمة الأثرع. لقد لوحظ ان النسخ العارى فى النباتات يسبب رسالة أو شفرة عدم ثبات أكثر منها فى حالة النسخ بسبب العمليات غير المناسبة.

إن استخدام الكودون فى جينات الجاما اندوتوكسين الأصلية يختلف بشكل كبير عن تلك التى وجدت فى الجينات النباتية الأساسية. الجينات الخاصة بالاندوتوكسين الأصلية تميل إلى محتواها المنخفض من Gtc كما فى الذرة (Murray وآخرون، ١٩٩١). جين الجاما اندوتوكسين عديم الأثرع يستنسخ فى النباتات المهندسة الوراثية قد ينتج من عدد من الأحداث ترتبط بمحتواها العالى من A+T. هذه تشمل إنهاء النسخ غير الناضج أو الدينالية المتعددة فى المناطق ذات المحتوى العالى من A+T أو الانقسام غير المناسب أو الوصل غير المناسب. عدم ثبات mRNA قد يكون ناتجا مع الانتهاء النووى الداخلى أو الخارجى عند تتابعات خاصة تفقد ثبات الرسالة خلال الاستنساخ أو يخلق توقف مؤقت بسبب تكوين تركيبات ثانوية. عدم ثبات mRNA قد يكون ناتجا كذلك من النقل غير الفعال بسبب الاستخدام غير الجيد للكودون.

لكي نوضح المشاكل المذكورة أعلاه ولتحقيق تعبير عالى عن جينات التحول Bt فى النباتات أجريت العديد من المحاولات لتحويل تتابع النيوكلوئيد للجينات الأصلية دون تدخل

فسي نأتج البروتين. في تصميم الجين المخلق للتعبير في النباتات يجب أن تؤخذ العوامل التالية في الاعتبار:

١. التتابعات التي تتداخل مع كفاءة تعبير الجينات يجب أن تزال ويتخلص منها. مثل هذه التتابعات تشمل الإشارات النباتية العديدة الأدينالية مثل: AATAAA, AATAA, AATATT, GATAAA, AATAAG.

٢. تتابع نهاية البوليميريز CAN7-9 AGTNNAA II. لقد اتضح أن هذا التتابع يكون تاليا لنهاية 3 في منطقة التشفير لجينات UZ snRNA هذا هام في التحويل في جينات Bt إذا وجد.

٣. إن CUUCGG hairpins مسئولة عن الثبات غير العادي للتراكيب الثانوية للحامض النووي RNA المرتبطة بمختلف العمليات البيوكيميائية الثبات الاستثنائي لدبابيس الشعر CUUCGG أدت إلى الاقتراح بأنها قد تكون ذات تركيب غير عادي وقد تكون ذات وظيفة في تنظيم النشئ المناسب للتراكيب المعقدة للحامض النووي RNA. هذه التتابعات التي تؤثر على mRNA وعملياتها في الخلايا النباتية تحتاج لتحويل.

٤. أماكن الوصل في النبات GTAGT : AAG = 5 و TTTT (PU) = 3 TTT(PU)T(PU)TGCAC:C (حيث P = البيورين) قد توجد في جينات الباسيلليس Bt وهذه يجب التخلص منها.

٥. التحويلات في تتابع النيوكلوئيد لجين Bt الذي يشفر المنطقة قد يعمل لتقليل محتوى A+T في تركيب الأساس للدنا DNA. بكتريا Bt المخلقة تصمم كي تحتوي على A+T حوالي ٥٠% وهي النسبة التي توجد في العادة في النباتات.

٦. عندما يخلق الجين لتحسين التعبير في خلية عائل غريب يكون مطلوباً تصميم الجين حتى نصل إلى أن تكرارته في اقترابات استخدام الكودون تقارب تكرارته في استخدام الكودون المفضل لخلايا العائل.

عندما أخذت هذه العوامل الستة في الاعتبار قام علماء شركة مونسانتو بتصميم جينات Bt وأجروا دراسات رائدة للتعبير عن جينات كراي 1Ab وكراي 1Ac المحورة جزئياً أو المحورة بشكل كامل (مخلقة) من نباتات القطن (Perlak وآخرون، ١٩٩٠، ١٩٩١). لقد زاد مستوى البروتين القاتل للحشرات في الخلايا النباتية بمقدار ١٠٠ مرة مما أدى إلى تحقيق مكافحة فعالة لديدان اللوز (جدول ٨-٢). لقد حدث نفس الشيء مع الجين

المشفر ICP، كراى A III فى البطاطس لتحقيق الحماية ضد الضرر الذى تحدثه خنفساء الكلورادو (Adang وآخرون، ١٩٩٣). لقد أمكن تحقيق تحسين فى التعبير عن جين كراى A III من خلال زيادة محتواه الشامل من G/C من ٣٦% الى ٤٩%. لقد استتبع هذه النجاحات تطوير العديد من المحاصيل المهندسة وراثيا لأنواع من جينات ICP المخلقة تحت سيطرة محفزات مختلفة. لقد تحققت نجاحات فى الذرة والأرز وفول الصويا (جدول ٨-٢). بناء على موافقة وتصريح Ap HIS (فبراير ١٩٩٥) تم السماح بإجراء اختبارات حقلية على ١١ نوع نباتى هندست وراثيا بجينات ICP فى الولايات المتحدة الأمريكية. هذه النباتات التفاح، الكانولا، الذرة، القطن، البطاطس، الأرز، الدخان، الطماطم، اللوز، الحور. فى المستقبل القريب سوف تختبر العديد من الأصناف النباتية المحورة وراثيا.

جدول (٨-٢): النباتات المهندسة وراثيا بجينات Bt المخلقة

| Plant | Gene | G+C content (%) | Bt protein content (% of soluble protein) | Target insect | Reference |
|--------------------|------------------|-----------------|---|--|---------------------------------------|
| Cotton | cry1Ab cry1Ac | 49 | 0.1 | Heliothis zea Pectinophora Gossypiella | Perlak et al. 1990 |
| Potato | cry3A | 49 | 0.3 | Leptinotarsa Decemlineata | Perlak et al. 1993 |
| Maize | cry1Ab | 65 | 0.17 | Ostrinia nubilalis | Koziel et al. 1993 |
| Rice | cry1Ab | 59 | 0.05 | Chilo suppressalis | Fujimoto et al. |
| (japonica) Rice | cry1Ac | 45 | 0.025 | Scirpophaga Incertulas | Wunn et al. 1996 Nayak et al. 1997 |
| (indica) Tomato | cry1Ab | 49 | 0.3 | Heliothis zea | Perlak et al. 1991 |
| Tobacco | cry1Ab | 49 | 0.03 | Heliothis virescens | Perlak et al. 1991 |
| Eggplant | cry1Ab | 59 | 0.03 | Leucinodes Orbonalis | Kumar et al. |
| Canola | cry1Ac | - | 0.4 | Plutella xylostella | Stewart et al. |
| Alfalfa | cry1C | 45 | 0.2 | Spodoptera litoOralis | Strixzhov et al. 1996 |

تأثير النباتات المهندسة وراثيا بجينات توكسينات بكتريا Bt على الحشرات الضارة التي تهاجمها:

من المعروف ان بعض النباتات ذات الأهمية الاقتصادية والتي تبدي مقاومة طبيعية ضد بعض الحشرات في بيئاتها الأصلية لم تتجح في مقاومة هذه الحشرات. لذلك لجأ المزارعون لاستخدام المبيدات الكيميائية للحد من أضرار هذه الحشرات. لكن نظرا للآثار السلبية التي تحدثها هذه المبيدات في البيئة، فقد ظهرت في الآونة الأخيرة إحدى الاستراتيجيات البديلة والتي تتمثل في وضع جينات جديدة داخل هذه النباتات لجعلها مقاومة للآفات.

من المعروف أيضا ان المستحضرات التجارية لبكتيريا الـ B.t. المحتوية على السبلورات السامة لهذه البكتيريا (Bt Cry proteins) بالإضافة الى الجراثيم استخدمت ومازالت تستخدم رشا لمكافحة بعض الحشرات على المحاصيل المختلفة. وهذه المبيدات الميكروبية تأثيراتها الضارة قليلة على البيئة مقارنة بالمبيدات الكيميائية التقليدية.

من هذا المنطلق اتجه كثير من العلماء في العقد الاخير من القرن العشرين لنقل الجينات المسؤولة عن إنتاج التوكسينات (ICP genes) من بكتريا الـ B.t. الى بعض النباتات ذات الأهمية الاقتصادية مثل القطن، التبغ، البطاطس، الطماطم والذرة. بهدف جعل هذه النباتات قادرة ذاتيا على إنتاج التوكسينات داخل خلاياها وبالتالي تصبح جميع اجزاء النبات سامة للحشرات التي تتغذى عليها (هذه التوكسينات لا تتناولها الحشرات القارضة فقط ولكن تستلعمها أيضا الحشرات الثاقبة الماصة). لقد اصبحت هناك اصناف من هذه المحاصيل المحورة وراثيا ماثوفة وتزرع على نطاق واسع في بعض دول العالم المتقدم كبديل لاستخدام المبيدات السامة لمكافحة الحشرات.

سوف نلقي الضوء على بعض هذه المحاصيل المحتوية على Bt cry genes والتي انتجتها بعض شركات البيوتكنولوجيا.

١ - القطن

أكدت التجارب ان اصناف القطن المهندسة وراثيا بجينات الـ Bt (ICP genes) مقاومة لبعض الحشرات مثل دودة براعم التبغ، دودة ورق القطن الصغري، ودودة اللوز القرنفلية، ودودة اللوز الأمريكية. حيث ان هذه النباتات اثرت على وزن اليرقات، اطالت فترة الطور اليرقي، كما انخفض تعداد اليرقات وانخفض وزن وعدد العذارى التي تصل الي طور الحشرة الكامل بزيادة فترة التغذية على هذه النباتات. علاوة على ذلك فان هذه الجينات الجديدة لم تؤثر لا على كمية محصول القطن ولا على صفات النيلة، حيث اثبتت

التجارب ان هذه الاصناف اعطت محصولا عاليا مقارنة بالاصناف الغير محورة وراثيا (العادية).

كما اثبتت الابحاث ان الاختلاف في درجة تاثير اصناف القطن المختلفة المهندسة وراثيا على ديناميكية تعداد بعض حشرات القطن يعزى الى اختلاف مستويات الدلتا اندوتوكسين δ -exotoxin من صنف الى اخر. يضاف الى ذلك ان كمية التوكسين تختلف ايضا باختلاف عمر النبات حيث وجد ان التوكسينات تكون موجودة بمتوسطات عالية داخل نبات القطن في مراحل النمو المختلفة ثم تبدأ في الانخفاض بمجرد ان يبدأ النبات في الدخول في مرحلة الشيخوخة.

اليوم يوجد اصناف من الـ Bt-cotton المنتجة تجاريا والتي تزرع في بعض دول العالم المتقدم. والتي تساهم في رفع انتاج القطن وتقلل من استخدام المبيدات السامة التي تدمر البيئة. اصبح انتاج هذه النباتات وزراعتها هو البديل عن استخدام المبيدات الكيميائية في مكافحة بعض الحشرات حرشفية الاجنحة التي تهاجم القطن وتسبب له ضررا اقتصاديا خصوصا وان كمية المحصول، صفات التيلة، ومحتويات البذرة لهذه الاصناف الجديدة لم تتاثر نتيجة تواجد جين جديد بداخلها.

وبذلك تعتبر اصناف الـ Bt-cotton من المنتجات المستقبلية التي سوف تقلل من استخدام المبيدات الكيميائية في انتاج القطن واكثر امانا منها.

٢- البطاطس:

قام بعض العلماء بنقل الـ Cry V-Bt gene والمتخصص ضد بعض الحشرات الحرشفية والغمضية الاجنحة من بكتيريا الـ B.t. الى احد اصناف البطاطس (Spunta) وذلك باستخدام الاجروباكتيريوم A. tumifaciens. لقد ابدى هذا الصنف مقاومة لكلا من حشرتي فراشة درنات البطاطس وخنفساء كلورادو حيث انخفض تعداد هذه الحشرات نتيجة تغذيتها على نباتات هذا الصنف. هذه المقاومة التي ابدتها هذا الصنف ضد هذه الحشرات كانت افضل من استخدام المستحضر البكتيري رشيا كل اسبوع او استخدام مبيد البيرمثرين رشيا كل اسبوعين او حتي معاملة البطاطس بمبيدات جهازية في بداية ومنتصف الموسم.

٣- الذرة:

في حين ان بكتيريا الاجروباكتيريوم لها القدرة على عدوي نباتات ذات الفلقتين (فكانت تستخدم في نقل Cry Bt gene الى هذه النباتات) الا انها لا تهاجم طبيعيا نوات الفلقة الواحدة مثل الحبوب مع ان الحبوب هدف رئيسي للتحسين الوراثي. نظرا لاهمية الحبوب فقد انبثقت طرائق بديلة لنقل الجينات مثل .. الادخال المباشر للـ DNA في الخلايا النباتية، ثم باستخدام زراعة الانسجة يتم استنبات الخلايا المعدلة لتنتج نباتات باكملها تحمل الجينات المنقولة.

في حوالي نهاية الثمانينات كانت هناك جماعات بحث مختلفة مشغولة كلها بالعمل من اجل ضم التقنيتين معا، أي التحور الوراثي وتجديد انماء النبات لاستخدامها في نباتات ذوات الفلقة الواحدة التي لها اهميتها زراعية. وحدثت اوجه تقدم في استخدام بكتريا الاجروباكتيريوم لتعديل الذرة وراثيا وفي تجديد نبات الارز باستزراع بروتوبلاست الارز، وفي احداث تعديل في الذرة بالتقريب الكهربائي (كانت النباتات الناتجة عقيمة). في عام ١٩٨٩ تم تجديد انماء نبات الذرة من البروتوبلاستات (ولكن هذا التكنيك لم يفلح). في عام ١٩٩٠ كانت ثمة اعلان عن ذرة خصبة تم تعديلها وراثيا بادخال جزيئات مغلفة من الـ Bt δ -exotoxin DNA باستخدام "مسدس جين" gene gun لاطلاق طلقات معدنية دقيقة الصغر مغلفة بالجينات المناسبة تطلق مباشرة لداخل الخلية.

بعد ذلك امكن لشركات البيوتكنولوجي انتاج اصناف من الذرة بها جينات بكتيريا الـ B.t. المسئولة عن افراز التوكسينات السامة. لقد استخدمت هذه الشركات بعض النواقل مثل فيروس موزايك القرنيبيط، حبوب اللقاح او مادة phosphoenolpyruvate (carboxylase PEGC) لنقل هذه الجينات الي نباتات الذرة.

لقد اثبت التجارب ان اصناف الذرة المحتوية على الـ Bt toxin genes مقاومة للافات الحشرية التي تهاجم نباتات الذرة مثل حفار ساق الذرة الاوروبي، دودة الحرب، حفار الذرة، ودودة كيزان الذرة كما وجد ان تغذية يرقات دودة كيزان الذرة على اغلفة الكيزان والشعيرات الحريرية للكوز تؤثر على نموها كما تؤدي الي موت نسبة عالية منها. يمكن القول ان اصناف الـ Bt-corn تخفض من نسبة اصابة الذرة ببعض الحشرات التي تهاجمه وتقلل الضرر الي مستويات منخفضة كما تقلل اصابة الكيزان واعداد اليرقات/كوز بدودة كيزان الذرة وترفع بالتالي من انتاجية الذرة.

كما اثبتت الابحاث ان حبوب الذرة المحور وراثيا احتوت على كميات من الـ Bt Cry proteins اثرت على تعداد حشرات المواد المخزونة التي تهاجم هذه الحبوب في

المخزن مثل دودة جريش الذرة وفراش الحبوب. كما اجريت دراسات معملية حديثة (٢٠٠١) شملت تأثير حبوب الذرة المحتوية على توكسينات البكتيريا على فترات النمو ، الكفاءة التناسلية وتعداد هذه الحشرات. وقد اوضحت النتائج ان هذه الحبوب الناتجة من نباتات ذرة محورة وراثيا ادت الى اطالة فترات نمو الحشرتين وخفضت من كفاءتهما التناسلية كما ادت الى تقليل تعدادهما.

مقاومة الحشرات الضارة للنباتات المحورة وراثيا (Bt plants).

ان النباتات المهندسة وراثيا (Bt plants) والقادرة على انتاج الاندوتوكسينات في انسجتها. اصبحت تنتج تجاريا خلال العقدين الاخيرين. هذه النباتات نجحت في تقليل الاعتماد على المبيدات السامة في مكافحة الحشرات، الا ان هذا النجاح سوف لا يستمر طويلا اذا ظهرت سلالات مقاومة للتوكسينات Bt toxins او اذا احتجنا لاستخدام المبيدات السامة في مكافحة بعض الحشرات الاخرى على نفس النباتات المحورة وراثيا والتي لا تتأثر بال Bt toxins. لذلك يجب ان تكون هناك دراسات ايكولوجية تلعب دورا حيويا في وضع استراتيجيات لتفادي المشاكل التي سوف تتجم عن زراعة هذه النباتات المحتوية على جينات ال Bt toxins. على سبيل المثال تحديد العوامل البيئية التي تؤثر في معدل سرعة ظهور السلالات المقاومة ، دراسة التفاعل بين النبات والحشرة .. الخ.

لقد اوضحت الدراسات الحديثة ان المقاومة المبنية على اساس وراثي في الحشرات لل Bt toxins تشابه مقاومة الحشرات للمبيدات الكيميائية. في هذا المجال اشار بعض الباحثين الى ظهور جينات مقاومة لل Bt toxins في حشرة دودة براعم التبغ، والفراشة ذات الظهر الماسي. كانت احد الافكار التي طرحت لتقليل ظهور سلالات مقاومة لل Bt toxins هو اتباع استراتيجية ادخال اكثر من جين (كل جين مسئول عن افراز توكسين معين مثل CryI(A), BIC , CryII toxins .. الخ) اما دوريا او تتابعيا او كخليط لتجنب سرعة ظهور سلالات مقاومة. لكن تواجد صفة عبور المقاومة للتوكسينات المختلفة وقدرة الحشرات على ان تصبح مقاومة لاكثر من توكسين سوف تكون من العوامل المحددة لنجاح استخدام هذه النباتات في الزراعة مستقبلا.

من الحشرات التي اظهرت مقاومة لل Bt toxins هي دودة اللوز القرنفلية (ولكن كانت الحشرات المرباة على قطن محور وراثيا تتزاوج مع الحشرات المرباة على القطن العادي). كذلك اظهرت حشرة حفار ساق الذرة الاوروبي مقاومة للذرة المهندس وراثيا (

(Bt-corn) وايضا دودة جريش الذرة الهندي اظهرت مقاومة بعد تغذيتها على حبوب ذرة معامل بال Bt.

لقد استخدمت بكتريا الباسيليس ثورينجينسيز Bt كمبيد حيوى منذ أكثر من حقبتين زمنيتين وكان يفترض أن تطور وتكوين السلالات المقاومة من الحشرات للبكتريا أقل بناء على التقارير الواردة من الكشف عن مقاومة مجاميع الآفات فى الحقول المفتوحة (de barjac وآخرون ، ١٩٨٧). بالرغم من المقاومة لبكتريا Bt سجلت فى المجاميع الحقلية للفراشة ذات الظهر الماسى (Tabashnik وآخرون، ١٩٩٠). هذه التقارير وغيرها أكدت على إمكانية تكوي المقاومة من جراء الانتخاب فى المعمل للوصول الى المقاومة لبكتريا Bt بواسطة العديد من الآفات (Mc Gaughey، ١٩٨٥). لقد تم الاستعراض المرجعى لمختلف نواحي مقاومة الحشرات لبكتريا Bt مثل الانتخاب فى المعمل، تقييم مخاطر المقاومة، التباينات بين المجاميع الحشرية المختلفة، تقنيات عبور المقاومة، الوراثة، الثبات، اللياقة وتكاليف وإدارة كل هذه النواحي (Ferre وآخرون، ١٩٩٥). فى هذا المقام سوف نتناول بعض تقنيات المقاومة واستراتيجيات السيطرة وإدارة عملية التطور.

الضغط الانتخابى المكثف لمجاميع الحشرات أدت الى تطور فطبع للمقاومة. يمكن أن تتحقق المقاومة بتقنيات مختلفة تتراوح من نقطة هضم السم الأولى Protoxin digestion الى إدخال التوكسين فى الغشاء. العوامل التى تؤثر على ارتباط التوكسين للمستقبل قد تؤدي الى مقاومة اختيارية. من جهة أخرى فإن المقاومة الناتجة من التغييرات عند الخطوات الشائعة مع كل التوكسينات مثل التحلل البروتينى للسموم الأولية والتغيرات التوجيهية واختراق الغشاء سوف تؤدي الى مقاومة مشتركة للأقسام المختلفة لتوكسينات البكتريا Bt. الدراسات التى اوضحت أن رقم حموضة المعى الأوسط وطبيعة البروتيزيس يحتتمل أن تشترك فى إحداث المقاومة (Oppert وآخرون، ١٩٩٤). لقد تم خفض الارتباط لتوكسين Bt للغشاء الخارجى للطبقة الطلائية للمعى الأوسط وتعريفه كتقنية لحدوث المقاومة لحشرة اليلوديا انثرينكتلا (Van Rie وآخرون، ١٩٩٠). والبلوتيللا زايلوستيلا (Ferre وآخرون، ١٩٩١، Bravo وآخرون، ١٩٩٢، أ، ب). اوضحت الدراسات التى استخدم فيها الكراى Ab 1 المعلم إشعاعيا حدوث خفض ١٠٠ مرة فى السمية فى النسبة بين السلالة المقاومة والحساسية لليلوديا انثرينكتلا. اظهرت سلالة D.xylostella من الفلبين حدوث ٢٠٠ مرة فى المقاومة للكراى 1Ab ولم يحدث أو

حدث بشكل قليل ارتباط التوكسين للغشاء الطلائى للمعى الأوسط بالمقارنة بالسلالة الحساسة.

على عكس النتائج التى تحصل عليها من يلوديا انترينكتيلا وحشرة بلوديا زيلوستيلا وفى تجارب مستقلة على دودة اللوز الشوكية وجد عدم وضوح فى الارتباط بين ارتباط التوكسين والمقاومة للكراى 1Ab أو الكراى 1Ac (Gould وآخرون، ١٩٩٤، McIntosh وآخرون، ١٩٩١). الدليل الوحيد ضد اشراك خطوة الارتباط فى تقنية كلا المقاومة والتخصصية تم توصيفه (Wolfersberger، ١٩٩٠). لقد وجد الباحث أن *Lymantria dispar* وجود ارتباط سالب بين القابلية للارتباط والسمية فى نوعين مختلفين من توكسينات Bt تجاه سلالة فردية من الحشرة. لذلك اتفق على أنه كلما زادت ارتباط البروتين السام كثيراً قلت القابلية عما هو الحال مع البروتينات الأقل سمية. أظهرت نتائج Wolfersberger توافقه مع الفكرة بوجود اختلافات فى السمية وكذلك اختلافات فى القدرة على الارتباط.

من الملاحظات الهامة ذات المعنوية تطور المقاومة فى اليلوديا انترينكتيلا للتوكسينات المتعددة (McGaughey and Johnson، ١٩٩٢). التكرارية الملحوظة لحدوث المستعمرات المقاومة من الحشرة يبدو أنها كانت عالية جداً لنوعين من الطفرات المستقلة كل منها تغير مستقبل متخصص لكى يحدث توافقاً فى الحشرة. من الممكن أن المقاومة التى ترجع إلى طفرة فى موقع واحد تنتج أنواع من التوكسينات غير فعالة كما هو الحال مع دودة اللوز الأمريكية ذات المقاومة الواسعة (Gould وآخرون، ١٩٩٢). من الممكن كذلك أن هذه المستقبلات لحد ما تتداخل أو تكون كالعنقود لدرجة أن الطفرة الفردية تؤثر على صفات الارتباط للتوكسينات العديدة. لقد لوحظ حديثاً أن الجين المنفرد كان مسئولاً عن حدوث المقاومة فى الفراشة ذات الظهر الماسى (DBM) لأربعة بروتينات BT (Tabashnik وآخرون، ١٩٩٧). من المطلوب بذل مجهودات أكبر لمعرفة كيفية إحداث فعل التوكسين حتى يمكن فهم أساس تطور المقاومة والتعامل مع المشاكل العملية الخطيرة إذا جاء الوقت الذى تستخدم فيه بكتريا Bt بشكل مكثف.

إدارة المقاومة Resistance management

مع عقلانية حقيقة أن الحشرات يمكن أن تطور المقاومة للباسبيليس Bt. تركز الجهود الحالية نحو تطوير استراتيجيات النشر التى قد تؤخر أو تمنع نشوءه وتطوره.

التعبير الخاص ببكتريا Bt فى النباتات المهندسة وراثيا قد تودى الى الانتخاب المستمر للآفات فى اتجاه المقاومة الشديدة لأن الحشرات تتعرض للبكتريا Bt حتى لو لم تسبب ضرر اقتصادى (Mallet and Porter, 1995). لقد اقترحت استراتيجيات مختلفة للتغلب على تطور مشكلة المقاومة وقام بتلخيصها Whalon and McGanghey (1993). لقد أدخلت هذه التكتيكات بعد تلك التى استخدمت أو اقترحت فى السيطرة وإدارة المقاومة للمبيدات الحشرية الكيميائية والتى تتضمن إشراك الآتى:

- ١- دورة وتغييرات التوكسينات .
- ٢- مخالطة أو تتابعات التوكسينات .
- ٣- توفير المأوى والملاذ .
- ٤- الجرعات العالية جداً من التوكسين .
- ٥- التعبير المؤقت والمكافئ بجينات توكسين Bt فى النباتات المتحولة وراثيا

١- الدورات Rotations

الدورة أو تغيير توكسينات Bt والمبيدات واستراتيجيات مكافحة الزراعة والحيوية تعتبر من الاقترابات لإدارة المقاومة. يعتمد نجاح هذه التكتيكات على إعادة الحساسية عند وقف الضغط الانتخابى أو التغيير نحو جين آخر أو توكسين أو مبيد حشرى آخر. الدورة بين التوكسينات التى تعبر عن المقاومة المشتركة لكل منها والأقرين ذات قيمة محدودة (Gould, 1988, Gould وآخرون, 1992). الدراسات التى توضح عدم ثبات المقاومة للباسبيليس Bt فى *P.xylostella* (Hama وآخرون, 1992) و *H.virescers* (Sims and Stone, 1991) وحالة واحدة من عبور المقاومة السالبة فى *P.interpvnctella* (Van Rie وآخرون, 1990) أدت الى الاقتراح بان الدورات قد تبطل من تطور المقاومة فى بعض المواقع. لقد وجد McGavghy and Beemam (1988) أن المستويات العالية من المقاومة فى *P.interp* كانت ثابتة لفترات طويلة وفى بعض الحالات قد لا تكون الدورات فعالة.

٢- مخلوط التوكسينات

إن مخلوط التوكسينات يعتبر من التكتيكات البسيطة نسبياً الذي يمكن استخدامه في التطبيقات التقليدية والنباتات المهندسة وراثياً. يبنى هذا الاقتراب على نظرية الاحتمال والتي توجد إذا كانت المقاومة لكل مكون في المخلوط نادرة ومن ثم فإن الأفراد ذات المقاومة لكل المكونات سوف تكون نادرة أو غائبة. لذلك فإن المقاومة المشتركة الشديدة والمكثفة بين توكسينات Bt المختلفة قد تؤدي إلى خفض المردود بأن المخلوط سوف يتغلب بشكل فعال على المقاومة (Gould وآخرون، ١٩٩٢). العديد من المجاميع الحقلية لحشرة *P.xylostellaa* سرعان ما تصبح مقاومة لمخلوط في سلالتان Bt التي تحتوي على الأقل ستة توكسينات كراي 1A، كراي Ic ، Cry II. مطلوب مزيد من البحوث للكشف عن نظام استجابة الأنواع المختلفة من الحشرات لمخاليط Bt قبل وضع التوصيات المناسبة مما يؤكد منع المقاومة.

٣- المأوى Refuges

توفير ظروف معيشة وبقاء الحشرات الحساسة واحد من أفضل الاقتراعات في خفض تطور المقاومة. أظهرت النتائج من دراسات النماذج أن المأوى وهجرة الحشرات الحساسة في مجاميع الآفة يمكن أن تبطل من نشوء المقاومة. لقد تأكد وعُضد هذا الموقف من نتائج الدراسات المعملية على دودة اللوز الأمريكية وحشرة *P.xylostelh*. النشر المكاني والموقت لإمكانات المأوى تسهل التزاوج العشوائي بين الحشرات البالغة الحساسة والمقاومة وقد تحد من حركة البرقات بين النباتات المعاملة بيكتريا Bt وغير المعاملة (Mallet and Porter، ١٩٩٢). المأوى المكاني يمكن أن يزود بين الأنسجة داخل النباتات بتأكيد التعبير المتخصص النسيجي لجينات Bt وكذلك بين النباتات داخل الحقل بواسطة زراعة النباتات المهندسة وغير المهندسة وراثياً بنسبة معروفة أو بين الحقول والتي تجاور حقول مزرعة بأصناف نباتية تختلف في حساسيتها لحشرة معينة. لقد أشار Denhdm and Rowland (١٩٩٢) إلى استراتيجية الجرعة العالية مع أماكن معيشة غير معاملة كوسائل فعالة في إدارة تطور المقاومة في النباتات المتحولة وراثياً. هذا الاقتراب يشير إلى أنه يقوم بتعديل التعبير المستمر والتركيبى لتوكسينات Bt في النباتات المتحولة وراثياً وهو يستطيع أن يقتل كل الزيجوات غير المتجانسة بشكل

كافى فى المجموع. هذا الاقتراب غير ممكن مع التطبيق التقليدى لبكتريا Bt لأن الرش على المجموع الخضرى لا يمكن أن يغطى النبات جيداً وبتجانس ومن ثم لا يثبت لفترة كافية لتحقيق التعبير المستمر للبكتريا Bt.

٤ - الجرعة فائقة أو متناهية الكبر Ultra high dose

يمكن استخدام جرعة متناهية فى الكبر عندما تكون الحشرات المستهدفة حساسة جداً والتعبير الخاص ببكتريا Bt فى النباتات المهندسة وراثياً عالية جداً (١ % من البروتين الكلى). من الممكن تطوير هذه النباتات بتعبير الجينات فى الكلوروبلاست (McBride وآخرون، ١٩٩٥). هذه الجرعة عالية بما فيه الكفاية كى تقتل حتى الأفراد المقاومة متجانسة الزيغوتات. هناك شك مستمر بسبب أن الجرعة الأعلى حتى ٢٦٨ جم/لتر من مستحضر Bt لا تقتل الأفراد المقاومة من *P.xylostella*. كما ذكر سابقاً فإن القابلية للارتباط فى التوكسينات تعتبر التقنية الأولية للمقاومة فى *P.xylostella*. إذا كانت اقترابات القدرة على الارتباط صفر فإن محاولات قتل الحشرات المقاومة باستخدام الجرعة العالية قد تكون غير ذات جدوى (Tabashnik، ١٩٩٤).

٥ - التعبير الجينى المتحكم فيه Controlled gene expression

التعبير المكانى والموقت والمحفز لجينات بكتريا Bt فى النباتات المهندسة وراثياً تعتبر واحدة من ملامح استراتيجيات الإدارة ضد الآفات. التعبير التركيبى والمستمر لجينات بكتريا Bt أدت الى ضغط انتخابى معنوى على مجاميع الآفة. التخصص النسيجى (أوراق - سوق - جذور - لوز - براعم - بذور) والتخصص الطورى (خضرى - تكاثرى) وبادئات ومحفزات الجروح الخاصة أصبحت فى المتناول الآن والسئى يمكن أن تستخدم لعقلانية وتدوير التعبير الجينى لبكتريا Bt باستخدامها نفسها (Williams وآخرون، ١٩٩٢). كل هذه الاقترابات تحتاج الى التأكيد تجريبياً بنظام متجانس. لسوء الحظ فإن أى من النباتات المهندسة وراثياً لم تتعرض للتحدى التجريبى للحشرات المقاومة لبكتريا Bt. مازلنا فى حاجة الى مزيد من البحوث والدراسات لتقييم دور سلوك الحشرة وغيرها من العوامل البيولوجية

والأيكولوجية والوراثية في تطور المقاومة في الحشرات لبكتريا Bt والنباتات المهندسة وراثيا ببكتريا Bt.

التأثيرات الجانبية للنباتات المحورة وراثيا (Bt-plants) على الأعداء الحيوية
من المعروف ان الطفيل الحشري يحتاج الي عائل واحد فقط ليكمل عليه دورة حياته .. بينما يحتاج المفترس الي العديد من الفرائس (الضحايا) ليكمل دورة حياته.
تعتبر النباتات المهندسة وراثيا والمحتوية على جينات مسئولة عن إنتاج التوكسينات السامة (Bt Cry genes) لها فوائد زراعية كثيرة .. ولكن هذه التكنولوجيا الجديدة لها تأثيرات مباشرة وغير مباشرة على سلوك الأعداء الحيوية سواء على المستوى الفردي او المجموع.

تأثير النباتات (Bt-plants) على سلوك وفسولوجيا المتطفلات الحشرية:
التأثير على يرقات الطفيل:

ان النباتات المحتوية على جينات ال ICPs والمقاومة للحشرات الضارة تؤثر على المتطفلات الحشرية بطريقة مباشرة وغير مباشرة - بمعنى ان هذه النباتات اما ان تؤثر على مناسبة العائل الحشري الذي يتطفل عليه الطفيل (تأثير غير مباشر) او ان الطفيل يتغذى مباشرة على البروتينات السامة اثناء تغذيته على انسجة العائل الحشري (تأثير مباشر).

لقد ذكر بعض الباحثين ان يرقات المتطفلات الحشرية التي تتطفل على عوائل نباتية بكتيرية عالية المقاومة لا تستطيع ان تكمل دورة حياتها نتيجة لموت العائل الحشري. ايضا النباتات التي تحتوي على مستويات منخفضة من التوكسينات السامة تعيق نمو الافة الحشرية وتقلل من استهلاكها للغذاء النباتي فيقل وزنها وبالتالي تؤثر على المتطفلات الحشرية. فعلى سبيل المثال .. فان معاملة يرقات الفراشة ذات الظهر الماسي بجرعات تحت مميتة من المبيد البكتيري اعاقبت عملية تعذر احد الطفيليات التابعة لعائلة Fam. Braconidae ، ولكن نفس هذه اليرقات المعاملة لم تؤثر على طفيل اخر تابع لنفس العائل حيث ان نسبة تعذر يرقات هذا الطفيل لم تختلف عن يرقات العائل المعاملة ببكتريا Bt عن الغير معاملة. في بعض طفيليات عائلة Tachinidae لم يتأثر نمو يرقات داخل يرقات خنفساء كلورادو والمعاملة بجرعات تحت مميتة من ال Bt - ولكن تأثر فقط خروج الحشرات الكاملة للطفيل (قلت نسبة الخروج).

أي يمكن القول ان الانخفاض في جودة العائل الحشري (نتيجة تغذيته على الـ Bt plants) يمكن ان تؤدي الى خفض في نسبة بقائية يرقات طفيلياته، نسبة خروج الحشرات الكاملة للطفيل، حجم الحشرات الكاملة والكفاءة التناسلية لهذه الطفيليات.

التأثيرات المباشرة للنباتات Bt على الحشرات الكاملة للمتطفلات الحشرية.

من المعروف ان الحشرات الكاملة للمتطفلات الحشرية تعيش حرة وتحصل علي احتساباجاتها الغذائية علي رحيق الازهار او الندوة العسلية او دم العائل. من الجدير بالذكر فان التوكسينات التي تنتج داخل نباتات الـ Bt ممكن ان تنتقل الي حبوب اللقاح، رحيق الازهار والندوة العسلية. لكن هذه التوكسينات السامة (Bt toxin proteins) تكون متخصصة ضد حشرات حرشفية وغمدية الاجنحة وغير سامة للحشرات الكاملة للطفيليات. فعلي سبيل المثال وجد ان الحشرات الكاملة للطفيل *Nasonia vitripennis* لم تتأثر عندماغذيت علي محلول من عسل النحل يحتوي علي الـ CryIAC توكسين - كما ان التغيير في محتوى دم العائل نتيجة تغذيته علي النباتات المهندسة وراثيا قد يؤثر علي المتطفلات الحشرية ولكن هذه الملاحظة لم يتطرق اليها احد من الباحثين.

يجب ان نشير هنا ايضا الي انه من اجل ان تتكاثر اناث المتطفلات الحشرية فانهما تبحث عن العوائل الحشرية المناسبة. حتى تستطيع هذه الاناث ان تجد عوائلها المناسبة وتنجح عملية التطفل فانهما تمر بعدة مراحل هي: البحث عن البيئة المناسبة - الوصول الي العائل - قبول العائل للطفيل - مناسبة العائل لنمو الاطوار الغير كاملة للطفيل .. وعملية العثور اناث الطفيليات علي عوائلها تكون من خلال احدي هذه الوسائل .. بحث عشوائي - الرائحة التي يصدرها النبات او العائل الحشري - الحس البصري - التلامس .. الخ - وبالتالي فان وضع جينات جديدة وغريبة داخل النباتات ممكن ان تؤدي الي تغيير في صورة (تركيب) الزيوت الطيارة التي تفرزها هذه النباتات وتجذب الطفيليات. نظرا لان دخول جين جديد الي النبات يؤدي الي حدوث تغير جيني للنباتات هذا التغير يؤدي الي حدوث تغير في التركيب الكيميائي للروائح التي تطلقها هذه النباتات ونتيجة لذلك فان المتطفلات الحشرية قد لا تستطيع العثور علي عوائلها المناسبة: مثال ذلك .. فان بعض الباحثين ذكروا ان الكربن المهندس وراثيا ادي الي خفض نسبة التطفل علي من الكربن بطفيل *Diaeretiella rapae* لان هذا الكربن انتج كميات قليلة من مادة الجليكوسينولات وهي المادة التي يعتمد عليها الكربن في تكوين الروائح التي يطلقها لجذب هذا الطفيل ولكن الكربن العادي ينتج كميات عالية من هذه المادة.

التأثيرات الغير مباشرة للنباتات Bt علي الحشرات الكاملة للمتطفلات الحشرية. ان تغذية الآفات الحشرية الضارة علي النباتات تحدث تغيرات في درجة انبعاث روائح كيميائيات التواصل التي تصدرها هذه النباتات (Synomones) مما يجعل النبات اكثر جذبا لانهات الطفيليات. حيث لاحظ كثير من الباحثين ان اناث بعض المتطفلات الحشرية تنجذب نحو النباتات التي تتغذي علي يرقات سليمة (صحية) اكثر من النباتات التي تتغذي عليها يرقات معاملة بجرعات تحت مميتة من مبيدات الـ Bt. لقد وجد احد الباحثين ان نسبة التطفل علي يرقات دودة براعم التبغ باحد الطفيليات قد انخفضت علي نباتات التبغ المهندسة وراثيا بجينات الـ Bt toxins عن النباتات العادية .. ويرجع ذلك الي ان انخفاض درجة تغذية اليرقات علي نباتات الـ Bt ادى الي انخفاض جذب النبات للطفيل.

ايضا يلعب براز العائل الحشري دورا مهما في ايجاد انثي الطفيل لعائلها المناسب. حدوث أي تغير في رائحة الكيرومونات التي يصدرها العائل الحشري تؤثر في نجاح انثي الطفيل في الوصول الي عائلها ومن الممكن ان يؤدي تناول العائل الحشري للتوكسينات من الـ Bt plants ان يتاثر تركيب الكيرومونات.

كما تلعب التغيرات السلوكية للعائل الحشري الناشئة عن تواجده علي النباتات المهندسة وراثيا دورا مهما في التأثير علي نسبة التطفل عليها (بالزيادة او النقص) - فمثلا وجد ان معاملة يرقات بعض الحشرات بمبيدات الـ Bt قللت من قدرتها الدفاعية ضد هجمات الطفيل وبالتالي زادت نسبة التطفل. ايضا النباتات المهندسة وراثيا والتي لها تاثير مانع للتغذية تزيد من سرعة حركة العائل الحشري مما يؤدي الي هروبه من الطفيل. ولقد وجد انه عند تعرض اليرقات حديثة الفقس لحشرة دودة براعم التبغ لانهات الطفيل في المعمل فان نسبة التطفل علي نباتات الـ Bt-tobacco كانت منخفضة عن النباتات الغير محورة وراثيا وهذا يرجع الي اختلاف سلوك العائل الحشري علي النباتين.

بالاضافة الي التأثيرات السابقة .. فان النباتات المهندسة وراثيا والمقاومة للحشرات ممكن ان تؤثر علي النسبة الجنسية للمتطفلات الحشرية .. وهذا يحدث نتيجة لان الحشرات التي تتغذي علي هذه النباتات يقل حجمها وهذا يجعل اناث الطفيل تضع كميات اكثر من البيض الغير مخصب الذي ينتج ذكور.

التأثيرات الجانبية للنباتات Bt علي سلوك المفترسات

من المعروف ان المفترسات تعيش معيشة حرة في كلا من طوري اليرقة او الحورية والحشرة الكاملة - ولها القدرة علي الحركة وعادة لها مدي واسع من الفرائس. بعض المفترسات مثل ابي العيد تجد فرائسها عن طريق البحث العشوائي ولكن الحشرات الكاملة لاسد المن تصل الي ضحاياها مسترشدة بالروائح التي تصدرها النباتات - بينما هناك مفترسات اخرى مثل احد الاكاروسات المفترسة التابع لعائلة Fam. Phytoseiidae تجد فرائسها مسترشدة ايضا بالروائح النباتية والتي لا تصدر من النبات الا نتيجة تغذية الفرائس (افراد الافة) عليها.

امسا عن تأثير نباتات الـ Bt علي المفترسات فقد اكدت بعض الدراسات ان تغذية احد مفترسات ابي العيد من الخوخ المربي علي نباتات البطاطس Bt-potatoes (المحتوية علي Bt toxin متخصص ضد حشرات غمدية الاجنحة) لم تؤثر علي نسبة استهلاك المفترس للمن او علي نموه او كفاءته التناسلية. وايضا فان تغذية احد مفترسات ابي العيد وبقة الاوريس واسد المن علي حبوب لقاح ذرة محتوية علي توكسين متخصص لحشوية الاجنحة لم تؤثر علي هذه المفترسات.

على العكس من ذلك فقد لاحظ بعض الباحثين انه عند تغذية يرقات اسد المن علي حفار الذرة الاوروبى المربي علي نباتات ذرة محتوية علي الجين المسئول عن افراز توكسين الـ CryIAb ادي ذلك الي زيادة نسبة موت يرقات اسد المن ، طالبت مدة الطور اليرقي، بينما لم تتأثر يرقات اسد المن بتغذيتها علي دودة ورق القطن المرباه علي نفس نباتات الذرة.

أي ان هناك بعض الدراسات الحقلية اظهرت تأثير تنشيطي للنباتات المهندسة وراثيا علي الاعداء الطبيعية. بينما بعض الدراسات الاخرى اكدت ان لهذه النباتات تأثير عكسي (مثبط) للاعداء البيولوجية.

تأثير النباتات Bt علي ديناميكية تعداد الاعداء الطبيعية.

يرتبط مدي تأثير النباتات المهندسة وراثيا علي ديناميكية تعداد الاعداء البيولوجية بمجموعة من العوامل نسردها فيما يلي:-

- (١) فيما يتعلق بالنباتات المحورة وراثيا .. مثل مستوي مقاومة النبات - ناقل الـ Bt gene الي النبات - مدي امكانية حدوث تغيير في تركيب الروائح النباتية التي

بصدرها النبات - وجود احتياطي من النباتات القابلة للإصابة - حجم المحصول

...

(٢) فيما يتعلق بالآفة الحشرية .. مثل مدي حساسية الحشرة للتوكسين - وجود عوائل بديلة - التغير في سلوك الآفة الحشرية التي تحدث نتيجة زراعة هذه النباتات - نوعية المادة الغذائية التي تتناولها الآفة الحشرية - التغير في حجم الرائحة التي يصدرها النبات نتيجة تغذية الآفة الحشرية عليه - حركة الآفة.

(٣) فيما يتعلق بالعدو الحيوي .. مثل نوع العدو الحيوي (مفترس أو طفيل) - المدي العوائلي أو الفرائسي للطفيل أو المفترس - حركة العدو الحيوي - مدي حساسية العدو الحيوي للتوكسين الذي ينتجه النبات - الكفاءة البحثية للعدو الحيوي.

في هذا الإطار أكدت بعض الدراسات ان بعض طفيليات دودة براعم التبغ لم يختلف تعداداه معنويًا بين نباتات الـ Bt ونباتات التبغ العادي. كما ان نباتات التبغ المهندسة وراثيًا لم تؤثر على تعداد البق المفترس من عائلة Nabidae. كما ذكر بعض الباحثين ايضا ان نباتات الذرة المهندسة وراثيًا Bt maize لم تؤثر على ديناميكية تعداد مفترسات حفار ساق الذرة الأوروبية (بني العيد، بقعة الأوريس واسد المن) أي انه ليست هناك اختلافات معنوية بين كثافة هذه المفترسات ونسبة افتراسها لبيض الآفة على نباتات الذرة المهندسة وراثيًا والنباتات العادية. كذلك اظهرت الابحاث ان نباتات الـ Bt-cotton لم تظهر أي تأثير معنوي على تعداد المفترسات.

من الممكن احيانا ان يحدث انخفاض في تعداد الاعداء الطبيعية في الحقول المزروعة بالنباتات المحورة وراثيًا وذلك نتيجة لتأثير هذه النباتات على تعداد الآفة الحشرية ولكن ليس ذلك باهمية بكان اذا ما توافرت العوائل البديلة لهذه المفترسات والطفيليات في الحقول الزراعية.

لقد درس بعض الباحثين التأثير المشترك لاستخدام نباتات القطن (المحتوية على جرعات تحت مميتة) من توكسين الـ CryIAC مع الاعداء البيولوجية في مكافحة يرقات حشرة *Helicoverpa zea* ووجدوا انه لا يوجد اختلاف معنوي في التأثير على تعداد يرقات هذه الحشرة بين النباتات المهندسة وراثيًا والنباتات العادية في حالة غياب الاعداء الطبيعية. اما في وجود الاعداء الطبيعية فقد انخفض تعداد الآفة الحشرية على النباتات المهندسة وراثيًا بانخفاض معنوي مقارنة بالمرباه على نباتات القطن العادية.

اما عن تأثير نباتات الـ Bt على الاعداء البيولوجية للآفات الغير مستهدفة .. فلم تنل أي اهتمام من قبل الباحثين ومع ذلك يمكن القول بان هذه الاعداء البيولوجية قد تتأثر

نتيجة تناولها بعض المنتجات النباتية (حبوب لقاح مثلا) او تتغذي علي العائل الحشري الذي تغذي علي النبات المحتوي علي التوكسين السام. كما ان تقليل استخدام هذه النباتات المهندسة وراثيا تؤدي الي زيادة تعداد الافات الحشرية الثانوية ويعقب ذلك في تعداد اعداؤها البيولوجية.

اخيرا يمكن القول انه حتي الان فان الدراسات الحقلية لم تظهر أي تأثيرات سلبية للـ Bt crops علي الحشرات النافعة. لكن اوضحت بعض الدراسات المعملية ان تأثيرات سلبية مباشرة للـ Bt toxins علي الحشرات غير المستهدفة فعلي سبيل المثال زادت نسبة موت يرقات اسد المن عند تغذيتها علي غذاء صناعي يحتوي علي الـ CryIac. كما ذكر بعض الباحثين ان نسل الطفيل *D. rapae* لم يتاثر تعداده بتغذيته علي من الخوخ المربي علي نباتات محورة وراثيا. ولم يحدث انخفاض معنوي في عدد الموميوات ولا علي النسبة الجنسية وهذا يدل علي ان يرقات هذا الطفيل لم تتاثر بالبروتينات السامة او ان حشرات من الخوخ لم تتلغ كميات كافية من البروتين السام الذي يجعلها تؤثر علي الطفيل عندما يتغذي عليها.

تأثير التسميد علي انتاج التوكسينات السامة داخل النباتات المحورة وراثيا (Bt-plants). من الطبيعي ان النباتات التي تنمو في جو يحتوي علي نسبة عالية من ثاني اكسيد الكربون CO_2 يرتفع معدل قيامها بعملية التمثيل الضوئي. وهذا يؤدي بالطبع الي زيادة معدل الكربون عن معدل النيتروجين داخل النبات - أي تصبح معدلات النيتروجين داخل النبات منخفضة/وحدة نسيج نباتي.

أي ان ارتفاع نسبة CO_2 في الجو المحيط بالنبات يقلل من المحتوي النيتروجيني للنبات وهذا يؤثر بالطبع علي انتاجية البروتينات السامة داخل النباتات المحورة وراثيا (Bt-plants). ولذا فان اضافة الاسمدة الازوتية لهذه النباتات سوف يبطل التأثير السلبي (نقص عنصر النيتروجين في النبات) الناجم عن ارتفاع نسبة CO_2 في الجو المحيط بالنباتات (درس هذا الموضوع علي الـ Bt-cotton). وبما ان النباتات المحورة وراثيا تحتاج الي النيتروجين حتي تستطيع انتاج البروتينات السامة للحشرات فمعني ذلك ان زيادة نسبة CO_2 في الجو المحيط بهذه النباتات سوف يؤثر في استراتيجية استخدام هذه النباتات كبديل آمنه لمكافحة الحشرات.

في هذا المجال ايضا اوضحت الابحاث السابقة ان زيادة نسبة ثاني اكسيد الكربون في الجو المحيط بالنباتات يؤدي الي زيادة نسبة الكربون وقلة نسبة النيتروجين داخل انسجة

النبات وهذا بدوره يجعل الحشرات الضارة بهذه المحاصيل تستهلك كميات أكثر من المحصول الخضري لهذه النباتات حتي تحصل علي احتياجاتها البروتينية. كما ذكر احد الباحثين ان زيادة وزن الحشرة يتناسب طرديا مع تركيز عنصر الازوت داخل النبات، بينما كمية الغذاء الخضري المستهلك بواسطة الحشرة يتناسب عكسيا مع تركيز الازوت داخل النبات.

نستخلص مما سبق ان وجود معدلات عالية من CO_2 في الجو المحيط بالمحاصيل المحورة وراثيا سوف يؤدي الي هذه النباتات وانخفاض المحتوي الازوتي/وحدة نسيج داخل النبات مما يترتب عليه قلة انتاج هذه النباتات للبروتينات السامة فيقل تأثيرها علي تعداد الحشرات التي تهاجمها.

مدي الامان في التوسع في زراعة الـ Bt-plants :

يعتبر انتاج النباتات المحورة وراثيا والتي تنتج البروتينات السامة (Bt plants) من افضل الطرق البديلة لمكافحة الحشرات واكثرها امانا للبيئة المحيطة. وحاليا فان هذه المحاصيل المحورة وراثيا مثل القطن، الذرة، والبطاطس تزرع علي نطاق واسع في بعض دول العالم المتقدم وهذه المحاصيل اظهرت كفاءة عالية في مكافحة بعض الافات الحشرية التي تهاجمها مثل حفار ساق الذرة الاوروبي، دودة براعم التبغ، دودة اللوز القرنفلية، وخنفساء كلورادو .. الخ ، كما انها خفضت من كميات المبيدات الكيماوية التي كانت تستخدم في مكافحة هذه الافات، كما زادت انتاجية هذه المحاصيل. هذا بالاضافة الي بعض المنافع الاخرى لهذه المحاصيل والتي تتمثل في السماح للاعداد النافعة بان تلعب دورا مهما جنبا الي جنب مع هذه النباتات في استكمال مكافحة الحشرات النافعة لم يتاثر تعدادها نظرا لانخفاض مستوي المبيدات الكيماوية المستخدمة في المكافحة.

من الجدير بالذكر ان زراعة القطن المهندس وراثيا في امريكا وفر للمزارعين عام ١٩٩٨ ما يقرب من ٩٢ مليون دولار.

كما اثبتت العديد من الاختبارات ان منتجات هذه النباتات امنة للانسان والحيوان والبيئة. كما ان دراسات السمية (سواء الحادة او المزمنة) والتي استمرت لاكثر من ٤٠ سنة اظهرت ان المبيدات الميكروبية بما تحتويه من بروتينات سامة (Cry toxin proteins) امنة للتدييات. كما اكدت الدراسات الحديثة ان البروتينات

السامة التي تنتجها النباتات المحورة وراثيا غير سامة للإنسان ولا تسبب له امراض حساسية.

مستقبل نباتات Bt:

ان الاتجاه نحو زراعة المحاصيل المحورة وراثيا والمحتوية علي الـ Bt genes علي نطاق واسع كاحد البدائل الامنة في مكافحة الافات. تعتبر فرصة فريدة من نوعها .. للحصول علي منتجات صديقة للبيئة ، حماية البيئة من الاثار السيئة للمبيدات الكيماوية وزيادة العائد الاقتصادي للمحاصيل الزراعية. ولكن ظهور صفة المقاومة لبعض الحشرات ضد هذه النباتات المحورة وراثيا يعتبر العائق الاساسي في هذا المضمار بما سوف يكون له من اثار سلبية ... ولذلك فان النجاح او الفشل نحو التوسع في زراعة هذه المحاصيل يعتمد في المقام الاول علي توجيه الابحاث لدراسة ظاهرة المقاومة وكيفية التغلب عليها .. وبالفعل بدأت الشركات المنتجة لبذور هذه المحاصيل بمساعدة الباحثين واشراك المزارعين في جمع المعلومات اللازمة عن هذه المحاصيل وتوفير الاموال اللازمة برسم استراتيجيات لمواجهة كيفية التغلب علي صفة المقاومة في الحشرات ضد هذه المحاصيل المهندسة وراثيا.

REFERENCES

Dang, M.J., Brody, M.S., Cordineau, G., Eagan, N., Roush, R.T., Shewmaker, C.K. Jones A., Oakes, J.V. and McBride, K.E. (1993). The construction and expression of a *Bacillus thuringiensis* cryIII A gene in protoplasts and potato plants. *Plant Mol. Biol.* 21: 1131-1145.

Berliner, E. (1915). Uber die Schlaffsuch der mehlmotenraupe. *Z. Angew. Entomol.* 2: 29-56.

Bravo, A., Jansen S. and Peferoen, M. (1992). Immunocytochemical localisation of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins in intoxicated insects *J. Invertebr. Pathol.* 60: 237-246.

Crickmore, N., Ziegler, D.R., Feitelson, J., Schnepf, E., Lambert, D., Lereclus, D., Gawron-Burke, C. and Dean, D.H. (1995). Revision of the nomenclature of *Bacillus thuringiensis* cry genes Abstracts of the 28th Annual Meeting of the Society of Invertebrate Pathology. Bethesda, p. 14.

Dale, P.J., Irwin, J.A. and Scheffter, J.A. (1993). The experimental and commercial release of transgenic crop plants. *Plant Breed.* 111: 1-12.

Denholm, I. and Rowland, M.W. (1992). Tactics for managing insecticide resistance. *Annu. Rev. Entomol.* 37: 91-112.

Estruch, J.J., Carozzi, N.B., Desai, N., Duck, N.B., Warren, G.W. and Koziel, M.G. (1996). Transgenic plants: An emerging approach to pest control. *Nature Biotechnology* 15: 137-141.

Ferre, J., Escriche, B. Bal, Y. and Van Rie, J. (1995). Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *FES Microbiol. Fett.* 132: 1-7.

Gould, F. (1988). Genetic engineering pest management and the evolution of pests. *Trends Ecol. Evol.* 3: 515-518.

Hofte, H. and Whiteley, H.R. (1989). Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* 53: 242-255.

James, W.C., Teng, P.S. and Nutter, F.W. (1991). Estimated losses of crops from plant pathogens. In: D. Pimentel, (ed). *CRC Handbook of Pest Management*. CRC Press, Boca Raton, Vol. 1, pp. 15-50.

Krattitger, A.F. (1997). Insect Resistance in Crops: A case study of *Bacillus thuringiensis* (Bt) and its transfer to developing countries ISAAA, Ithaca, NY, pp. 14-16.

Kumar, P.A., Sharma, R.P. and Malik, V.S. (1996). Insecticidal cproteins of *Bacillus thuringiensis* *Adv. Appl. Microbiol.* 42: 1-43.

McGaughey, W.H. (1985). Insect resistance to biological insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Science* 229: 193-195.

McIntosh, S.C., Stone, T.B., Jokerst, R.s. and Fuchs, R.L. (1991). Binding of *Bacillus thuringiensis* proteins to a laboratory selected line of *Heliothis virescens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 8930-8933.

Nayak, P., Basu, D., Das, S., Basu, A., Ghosh, D., Ramakrishan, N.A, Ghosh, M. and Sen, S. (1997). Transgenic elite indica rice plants expressing cry1Ac δ -endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis* are resistant against yellow stem borer. (*Scripophaga incertulas*). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 2111-2116.

Oppert, B., Kramer, K.J., Johnson, D.E., McIntosh, S.C. and McGaughey, W.H. (1994). Altered protoxin activation by midgut enzymes from a *Bacillus thuringiensis* resistant strain of *Plodia interpunctella*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 198: 940-947.

Perlak, F.J., Deaton, R.W., Armstrong, T.A., Fuchs, R.L., Sims, S.R., Greenplate, J.T. and Fischhoff, D.A. (1990). Insect resistant cotton plants. *Bio/Technology* 8: 939-943.

Stewart, C.N., Adang, M.J., All, J.N., Raymer, P.L., Ramachandran, S. and Parrott, W.A. (1996). Insect control and doses effects in transgenic canola containing a synthetic *Bacillus thuringiensis* cry1Ac gene. *Plant Physiol.* 112: 115-120.

Tabashnik, B.E. (1994). Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu. Rev. Entomol.* B9: 47-49.

Tabashnik, B.E., Cushing, N.L., Finson, N. and Johnson, M.W. (1990). Field development of resistance to *Bacillus thuringiensis* in Diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *J. Econ. Entomol.* 83: 1671-1676.

Van Rie, J., McGaughey, W.H., Johnson, D.E., Barnett, B.,D. and Van Mallaert, H. (1990). Mechanism of insect resistance to the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Science* 247: 72-74.

Warren, G.w., Koziel, M.G., Mullins, M.A., Nye, G.J. Carr, B., Desai, N., Kostickka, K., Duck, N.B. and Estruch, J.J. 1996. Patent No. WO96/10083.

Yu, C.G., Mullins, M.A, Warren, G.W., Koziel, M.G. and Estruch, J.J. (1997). The *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A lyses midgut epithelium cells of susceptible insects. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 1532-1536.

الفصل الثاني

أمان ومميزات النباتات المحمية ببكتريا باسيلليس ثورينجنسيز في مكافحة الآفات الحشرية

مقدمة: المنتجات الميكروبية المبنية علي الباسيلليس ثورينجنسيز (Bt) استخدمت علي نطاق تجاري منذ ما يقرب من ٤٠ عاما بواسطة المزارعين بما فيهم مزارعي الزراعة العضوية لمكافحة الآفات الحشرية المستهدفة (Baum وآخرون ١٩٩٩). حديثا أمكن كلونة الجين او الجينات التي تشفر البروتينات التي تبديد الحشرات في هذه المنتجات الميكروبية وإدخالها والتعبير عنها في النباتات المحورة وراثيا لجعل النباتات قادرة علي حماية نفسها ضد التلف الذي تحدثه الحشرات. سوف نتناول في هذا المقام القاء الضوء عن:

- ١- ماهية النباتات المحمية ببكتريا Bt
 - ٢- لماذا تم تطوير النباتات التقليدية Bt
 - ٣- مميزات استخدام المحاصيل البكتيرية Bt
 - ٤- أمان الغذاء والأعلاف والبيئة للمنتجات المهندسة وراثيا ببكتريا Bt ومنتجاتها.
- هذه المعلومات سوف تساعد كثيرا في المناقشات العلمية الجارية عن مخاطر وأمان وفوائد هذه المنتجات علي الفلاحين والبيئة والمجتمع. قد يري البعض ان فيما استعرض تكرارا للأبواب السابقة ولكني أرد علي هذا التصور بأنه لا غشاضة حيث لكل كاتب اسلوبه الخاص وطريقة تناول الموضوع وعندما احس بأي تكرار له سوف أحاول تفادي الوضع بأفضل طريقة.

ما هي النباتات المهندسة وراثيا ببكتريا Bt:

النباتات التي حورت لانتاج البروتين القاتل للحشرات من بكتريا Bt تعرف علي أنها نباتات محمية ببكتريا الباسيلليس Bt-protected plants. الباسيلليس بكتريا من القرية موجبة لجرام ذات مقنرة علي تكوين أجسام بروتينية بللورية خلال التجزئ. هذه الأجسام تتكون من بروتينات (يشار إليها بروتينات كراي Cry proteins) وهو فعال اختياري ضد مدي ضيق من الحشرات ولكنه كقسم من البروتينات فعال ضد مدي عريض من الآفات الحشرية. بروتينات الكراي تنتج كتوكسينات أولية Protoxins والتي تنشط من خلال التحلل البروتيني بمجرد التناول. بروتينات الكراي ترتبط علي مواقع خاصة (هي

المستقبلات) في خلايا المعى الأوسط للحشرات ومن قنوات الأيونات الاختيارية في الغشاء الخلوي. يحدث انتفاخ في الخلايا بسبب تدفق الماء التي تؤدي إلى تحلل الخلايا ومن ثم موت الحشرات. العديد من سلالات Bt التي تحتوي على مخاليط حتى ٦ أو ٨ بروتينات كراي مختلفة استخدمت على نطاق واسع كمبيدات ميكروبية منذ عام ١٩٦١. الآن تمثل هذه المنتجات ما يقرب من ١-٢% من السوق العالمي للمبيدات الحشرية. المنتجات الميكروبية بالباسبيليس Bt كانت ومازالت من أفضل خيارات مكافحة الحشرات الزراعية العضوية. الجينات التي تشفر الكراي بروتين تعتبر من الخيارات الواضحة للتعبير النباتي كوسيلة لحماية النباتات ضد الآفات الحشرية. في عام ١٩٨١ تم كلونة أول كراي جين والتعبير عنه في بكتريا الشيرشيا كولاي وبعدها بسنوات قليلة تم أول إنتاج للنباتات المحورة وراثيا ببكتريا Bt من الطماطم والدخان والقطن.

الآن تسوق النباتات البكتيرية من البطاطس والقطن والذرة تجاريا في الولايات المتحدة الأمريكية وواحد أو أكثر منها تسوق في الأرجنتين وكندا والصين وفرنسا والمكسيك والبرتغال ورومانيا وجنوب أفريقيا وأسبانيا وأوكرانيا (James ٩٨ ، ١٩٩٩). هذه النباتات تعبر عن واحد من الكراي بروتينات المتعددة لمكافحة الآفات الحشرية من رتب حرشفية وغمدية الأجنحة (جدول ٨-٣). العديد من المحاصيل البكتيرية الأخرى مازالت تحت التطوير. مع أكثر من ١٠٠ كراي جين وصفت ودستات عديدة من النباتات المتحولة لإنتاج بروتينات الكراي توجد في الأفق احتمالات مبشرة كبيرة لتوسيع دور وقاية النباتات من خلال النباتات الميكروبية بالباسبيليس Bt. الجيل الثاني من النباتات المحمية بالباسبيليس تحتوي جينات كراي متعددة ومن ثم تزود المزارعين بمنتج واسع النشاط والفاعلية في مكافحة الآفات كما تقلل من احتمالات تطور سلالات مقاومة.

جدول (٨-٣): المحاصيل المهندسة وراثيا ببكتريا الباسبيليس التي تمت الموافقة عليها بشكل كامل في الولايات المتحدة الأمريكية

| المحصول | الكراي بروتين | الآفات المستهدفة مكافحتها | تاريخ التقديم الأول |
|------------------|-------------------|--|---------------------|
| البطاطس القطن | Cry 3A Cry IAC | خنفساء كلورادو البطاطس دودة براعم الدخان ، ديدان لوز القطن (القرنفلية) | ١٩٩٥ |
| الذرة | Cry Iab | ثاقبة الذرة الأوروبية ، دودة كينزان الذرة | ١٩٩٦ |
| الذرة | Cry IAC | ثاقبة الذرة الأوروبية ، ثاقبة الذرة الجنوبية الغربية | ١٩٩٧ |

لماذا تطور النباتات المحمية ببكتريا الباسيلليس Bt

النباتات المحمية بالبكتريا Bt. تواكب المعيار الفاتح لتطوير أي منتج في مكافحة الآفات ونخص بالذكر منها: الرؤيا الفنية، الحاجة، الفاعلية والأمان. هذه النباتات المحصورة وراثيا تقدم الأمل في الحصول علي مكافحة فعالة للآفات تنقسم بالأمان. بناء علي قاعدة المعلومات المكثفة عن أتلانمان واسترشادا بإربعين سنة من الاستخدام الأمان للمنتجات الميكروبية Bt اعتبرت هذه المنتجات كمبيدات قليلة المخاطر ومن ثم كان لها حالة خاصة في اتجاه أتلانمان من قبل الوكالات التشريعية. هذه العوامل دمجا مع الحاجة الشديدة لطرق مكافحة آفات افضل وما يعود علي البيئة من فوائد تقليل الاعتماد علي المبيدات الكيميائية بسبب الاعتماد علي النباتات المهندسة وراثيا وهي تمثل الاختيار الأفضل للمركبات الجديدة.

الجدوى التقنية Technical Feasibility:

حتى وقت قريب لم تكن الوسائل التقنية لإنتاج النباتات البكتيرية متاحة او ميسرة. الآن أدى توفر ودمج التقنيات الخاصة بزراعة الخلايا والطرق الجزيئية الحديثة الي السماح بتنوع واسع وعريض للصفات بما فيها جينات Bt والتي يمكن إدخالها بكفاءة ونشرها في النباتات لتحقيق مكافحة الآفات. حيث أنها بروتينات ومع التغلب علي مشكلة التعبير مع هذا القسم من البروتينات في النباتات أصبح في الإمكان إنتاج بروتينات ببكتريا Bt بشكل مباشر ومدرّوس. لقد تم تعريف الاف من سلالات ببكتريا Bt علي مستوى العالم والتي تزودنا بتنوع غير مسبوق وهائل للجينات والبروتينات الفعالة. خلاصة القول ان هذه السلالات تقدم مصدر غني جدا من جينات الكراي مما يعطي حجر الأساس لتطوير منتجات عديدة لمكافحة مجال واسع من الآفات الحشرية.

الحاجة Needs:

ينفق المزارعون بلايين الدولارات بسبب الفقد المحصولي او خفض الإنتاج من جراء الإصابة بالآفات التي يمكن مكافحتها بواسطة بروتينات كراي. في حالات مثل ثاقبة الخرة الأوروبية فان التلف الذي يحدث للنباتات بواسطة الجيل الثاني من الثاقبات والتي دخلت السيقان ومن ثم يصعب مكافحتها بالمبيدات التقليدية بالرّش الخارجي بالإضافة الي ذلك تستخدم مبيدات حشرية كيميائية هامة مثل البيرثريودات المخلقة علي القطن لمكافحة نودة البراعم وقد فقدت هذه المبيدات فعاليتها بسبب تطور ظاهرة مقاومة الآفة لفعالها (

Smith 1999). لذلك فإن هناك حاجة لوسائل مكافحة الآفات مقبولة من قبل الزراع تكون مخاطرها اقل كما تكون مقبولة بيئيا من حيث العلاقة بين التكلفة والفاعلية.

الفاعلية Efficiency:

لقد تأكدت الفاعلية المبنية على بروتين الكراي للمنتجات الميكروبية الباسيللية Bt. لقد تم التسويق التجاري لسلاسل Bt كورستاكي HD-1 عام 1961. لقد كانت هذه السلسلة لفترة طويلة قياسية من حيث الصناعة وقد استخدمت على نطاق واسع لمكافحة العديد من آفات رتبة حرشفية الأجنحة. فاعلية سلاسل Bt HD1 تنتج بشكل كبير من وجود أربعة بروتينات كراي : Cry 1Aa ، Cry 1Ab ، Cry 1Ac ، Cry 2Aa. جينات الكراي 1Ac ، 1Ab في سلاسل Bt HD1 تمثل الطرز الأولية Prototypes للجينات الجاري التعبير عنها في الذرة والقطن. تضاعف deployment بروتينات الكراي في النباتات تقدم فرصا عديدة لتحسين الفاعلية بالمقارنة بالنظم الميكروبية. على خلاف منتجات Bt الباسيللية الميكروبية فإن فاعلية وكفاءة النباتات المنتجة لبروتينات الكراي لا تتأثر بتوقيت التطبيق ودقته ولا خوف من الغسيل بماء الأمطار وفقد الفاعلية بسبب التعرض لضوء الشمس. النباتات البكتيرية الباسيللية تنتج كميات كافية من بروتين الكراي تأكيداً لدورها في مكافحة الحشرات. هذه الإسهامات وتوفير التكاليف التي تقدمها هذه المنتجات ساهمت لحد كبير في سرعة قبول والتوسع في استخدام هذه النباتات المحمية بالبكتريا من قبل المزارعين.

الأمان Safety:

العديد من الصفات المرتبطة كالوراثة بالنباتات المحمية ببكتريا الباسيللية Bt تعطي هذه المنتجات درجة من الأمان لا يمكن وجودها في أي من وسائل مكافحة الآفات الأخرى. بداية فإن البروتينات تقسم معروف ليس سام للإنسان والحيوانات بوجه عام كما أنه لا يتراكم حيويًا في الأنسجة الدهنية ولا يكون ثابتًا في البيئة كما هو الحال مع بعض المبيدات الكيميائية الهالوجينية. البروتينات ذات التأثيرات السامة على الإنسان والحيوان درست جيدًا وأمكن تعريفها بسهولة في الدراسات المعملية قصيرة المدى مع الأنواع المختلفة. الصفة الثانية تتمثل في أن بروتينات الكراي ذات درجة عالية من التخصص لهدف معين وأنواع قريبة الارتباط من الحشرات كما يجب أن يتم تناولها في الجهاز

الهضمي كي تحدث الفاعلية. كل كراي بروتين يؤثر نسبيا علي انواع قليلة من الحشرات وعندما يتم تناوله فقط بواسطة الاطوار اليرقية المبكرة حيث ان اليرقات الكبيرة والمتأخرة اقل حساسية. الصفة الثالث تتمثل في ان التعرض الانساني والغير مستهدف لبروتينات الكراي قليل للغاية. علي خلاف المبيدات المستخدمة علي الاوراق فان بروتينات الكراي توجد داخل النسيج النباتي بكميات صغيرة في حدود ميكروجرامات وتنتج بمستويات قليلة في حبوب اللقاح. بالاضافة الي عوامل الامان الاساسية هذه فان امان المنتج تاكد من خلال العديد من قواعد البيانات عن الامان من جراء الخبرات التي تحققت مع المنتجات الميكروبية الباسيلية. علاوة علي ذلك فان امان بروتين الكراي الذي ينتج في كل نبات مهندس ببكتريا Bt تاكد فرديا وبصفة مستقلة من خلال دراسات متخصصة عن الامان. امان الكراي بروتينات في المنتجات الميكروبية الباسيليس مقارنة بالامان في النباتات المحمية ببكتريا Bt سوف تناقش بالتفصيل فيما بعد. لقد تمتعت المنتجات الباسيلية بتاريخ طويل من الامان حول العالم علي امتداد ما يقرب من ٤٠ عاما.

مميزات استخدام المحاصيل المحمية ببكتريا الباسيليس:

خلال خمسة سنوات فقط من التعامل التجاري سرعان ما اصبح المزارعون علي قناعة بان النباتات الباسيلية BT تقدم وسيلة فعالة لزيادة انتاجية الزراعات المتواصلة لقد زادت المساحة المنزرعة بهذه النباتات المهندسة وراثيا ببكتريا الباسيليس مع القطن والذرة والبطاطس الي ما يقرب من ١٦ مليون اكر في عام ١٩٩٨ بما يمثل ١٧ ، ١٨% من المساحة الكلية للذرة والقطن علي التوالي (جدول ٨-٤). بناء علي التقارير التي نشرها James في سنوات ٩٧ ، ٨٩ ، ١٩٩٩ زادت المساحة العالمية من النباتات الباسيليس من حوالي ١٠ مليون اكر عام ١٩٩٧ الي ٢٠ مليون اكر عام ١٩٩٨ والي ٢٩ مليون اكر عام ١٩٩٩. ان فوائد خفض تكاليف الادارة المتكاملة للافات IPM وزيادة الانتاجية المحصولية والمرونة الكبيرة في الانتاج كلها مسئولة عن التطوير السريع لهذه المحاصيل. لقد امكن قسم بحوث الخدمات الزراعية في وزارة الزراعة الامريكية من استخدام هذه المحاصيل البكتيرية الباسيلية Bt وارتبطت بالحصول علي انتاجية محصولية عالية مع قليل من معاملات المبيدات لمكافحة الافات المستهدفة.

جدول (٨-٤): المساحة المزروعة بالمحاصيل المهندسة وراثيا ببكتريا الباسيلليس في امريكا (١٩٩٨ ، ١٩٩٩)

| المحصول | عدد الاكرات (مليون) ١٩٩٨ | النسبة المئوية للاكرات الكلية | عدد الاكرات (مليون) ١٩٩٩ | النسبة المئوية للاكرات الكلية |
|---------|--------------------------|-------------------------------|--------------------------|-------------------------------|
| الذرة | ١٤,٤ | ١٨ | ١٨ | ٢٢ |
| القطن | ٢,٣ | ١٧ | ٤ | ٢٨ |
| البطاطس | ٠,٠٥ | ٤ | ٠,٠٥ | ٤ |

المصدر: James (١٩٩٨ ، ١٩٩٩).

تناولت احدي الدراسات التي اجريت في المركز القومي للسياسة الغذائية والزراعية في امريكا التأثيرات الضارة لزراعة المحاصيل المحمية ببكتريا الباسيلليس Bt. لقد استنتج السباح ان التطور السريع لهذه التكنولوجيا يرتبط بالفوائد الكبيرة التي تحققت في مكافحة الافات وخفض التكاليف لدي الزراع. لقد اشار الباحثان جيانيسي وكارينتر (١٩٩٩) الي ان القطن البكتيري اضاف عائدات ٩٢ مليون دولار في امريكا عام ١٩٩٨. لقد خلص العلماء ان الفوائد التي تتحقق من جراء استخدام النباتات الباسيلية تشمل:

- أ- خفض المعاملات بالمبيدات الحشرية الكيميائية التقليدية
- ب- تحقيق فاعلية كبيرة في مكافحة الافات
- ت- زيادة الانتاجية المحصولية
- ث- تحقيق اضافات لمكافحة الافات التقليدية من خلال الحفاظ علي او زيادة اعداد مجاميع الكائنات النافعة
- ج- تقليل مستويات التوكسينات الفطرية.

تقليل او خفض معاملات المبيدات الحشرية: التوسع في استخدام وتطوير النباتات المهندسة ببكتريا Bt ادي الي خفض معنوي في استخدام المبيدات التقليدية. لقد ساعدت زراعة القطن البكتيري عام ١٩٩٦ مزارعي الاباما في استخدام اقل كميات من المبيدات في حقول القطن منذ الاربعينات. في عام ١٩٩٨ استخدمت مبيدات نقل بمقدار ٢ مليون رطل في مكافحة دودة اللوز ودودة البزاع في ستة ولايات منتجة للقطن بالمقارنة بما استخدم عام ١٩٩٥ (جدول ٨-٥). بعد ادخال القطن البكتيري عام ١٩٩٦ وصل المتوسط الكلي لتطبيقات ٢,٤ رشة لمكافحة حشرات بزاع ولوز القطن في كل ولايات زراعة هذا المحصول (ويليامز ١٩٩٧). قبل ١٩٩٦ كان متوسط استخدام المبيدات عاليا (٢,٩ وحتى

٦,٧ رشاشات) في الولايات الستة التي استخدم فيها القطن البكتيري. خلال السنوات الثلاثة التي استخدمت فيها النباتات البكتيرية قل عدد مرات استخدام المبيدات الحشرية لمكافحة ديدان براعم ولوز القطن الي حوالي ١,٩ رششة (جدول ٨-٦). خفض عدد مرات استخدام المبيدات الحشرية يساوي خفض ١٢% من الكمية الكلية من المبيدات المستخدمة. بالطبع فان بعض استخدامات المبيدات الحشرية قد تكون ضرورية لمكافحة هذه الحشرات والتي لا تكافح ببروتين البكتريا المعبرة عنه في النباتات.

جدول (٨-٥): خفض استخدام المبيدات الحشرية لمكافحة ديدان البراعم واللوز بعد ادخال القطن المحمي ببكتريا Bt (مقارنة استخدام المبيدات عام ١٩٩٥ مع استخدامات ١٩٩٨ *

| المبيد الحشري | استخدامات المواد الفعالة للمبيدات (x ١٠٠٠ رطل) |
|------------------------------|--|
| اميتراز (أوفاسين) | ٤٢ - |
| سيفلوثرين (بيثرويد) | ٣٥ - |
| سيبرمثرين (امو) | ٨١ - |
| دلتامثرين (ديسيز) | ١١ + |
| اس-فينفاليرات (اسانا) | ١٩ - |
| لمباداسينهاالوثرين (كاراثية) | ٨٥ - |
| ميثوميل (لايث) | ١٥٦ - |
| بروفينو فوس (كوراكرون) | ١٠١٤ - |
| سبينوساد (تراسير) | ١٩ + |
| ثيود يكارب (لارفين) | ٦٦٥ - |
| ترالومثرين (سكاوت) | ٤ - |
| الفا - سيبرمثرين (فوري) | ١ + |
| المجموع | ٢٠٤٤ - |

* المصدر: Gianessi and Carpenter (١٩٩٩).

اظهر الحصر المقارن بين مزارعي القطن في استراليا ١٩٩٨-١٩٩٩ ان خفض في استخدامات المبيدات الحشرية بعد ادخال النباتات القطن البكتيرية كان معنوياً. اعتماداً علي منطقة الزراعة تفاوتت نسبة الخفض في استخدامات المبيدات من ٢٧ وحتى ٦١% بمتوسط ٤٣% خفض. هذا يعادل خفض في عدد الرشاشات ٧,٧ رششة علي نباتات القطن البكتيرية Bt بالمقارنة بحقول القطن التقليدية. لقد كان الخفض في استخدام المبيدات في الصين المرتبط مع القطن البكتيري اكبر كثيراً (Xia وآخرون ١٩٩٩). خلال اربعة

سنوات من الاختبرات تناقص استخدام المبيدات الحشرية ٦٠-٨٠% عما هو الحال مع المبيدات الكيميائية في القطن التقليدي. في البلدان مثل الهند ذات النظم الزراعية الاستوائية والتي تعاني من ضغط انتخابي عالي للآفات الحشرية مما استلزم استخدامات كميات كبيرة من المبيدات كان الخفض في استخدام المبيدات مقارنا ومقابلا للخفض الذي لوحظ في الصين. من الصعب تقييم الخفض في كميات المبيدات المرتبطة مع ادخال الذرة البكتيري. الاصابة بالآفة الاولى المستهدفة. هي ثاقبة الذرة الاوربي كانت تتباين من سنة لآخري. المبيدات الحشرية التي استخدمت لمكافحة ثاقبة الذرة قد تكون مطلوبة لمكافحة آفات آخري اقل حساسية لبكتريا Bt. لقد اجاب ٣٠% من مزارعي الذرة البكتيرية انهم قاموا بزراعة لمكافحة ثاقبة الذرة الاوربية بغرض تقليل استخدام المبيدات ضد هذه الآفة. لقد انخفضت مساحات الذرة التي عوملت بالمبيدات الحشرية الخمسة الموصي بها لمكافحة هذه الحشرة بحوالي ٧% عام ١٩٩٨. لغراض تحليل البيانات افترض الباحث ان ثلث الخفض تقريبا (٢,٥%) كانت ترجع الي ادخال الذرة المهندسة ببكتريا Bt مما ادي الي الاستنتاج بان كميات المبيدات نقصت بمقدار يساوي المطلوب لعلاج ٢ مليون اكر في عام ١٩٩٨. لقد اشار Rice (١٩٩٨) ان استخدامات المبيدات في حقول الذرة تناقصت بمقدار ١,٢ مليون رطل اذا تم زراعة ٨٠% من مساحة الارض المزروعة بالذرة المحور وراثيا ببكتريا Bt.

جدول (٨-٦): عدد معاملات المبيدات الحشرية في القطن لمكافحة ديدان براعم ولوز القطن قبل (١٩٩٥) وبعد (١٩٩٦-١٩٩٨) ادخال القطن البكتيري بالباسبيليس Bt*

| الولاية | ١٩٩٥ | ١٩٩٦ | ١٩٩٧ | ١٩٩٨ |
|----------|------|------|------|------|
| الاباما | ٦,٧ | ٠,١ | ٠,٥ | ١,٤ |
| اريزونا | ٢,٩ | ١,٧ | ٠,٩ | ٠,٤ |
| فلوريدا | ٥,٧ | ١,١ | ١,٠ | ٢,٠ |
| جورجيا | ٣,٤ | ١,٧ | ٢,٥ | ١,٥ |
| لويزيانا | ٤,٧ | ٣,٩ | ٣,٢ | ٣,٥ |
| ميسيسيبي | ٥,٧ | ٢,٢ | ٢,٥ | ٢,٥ |

*المصدر: Williams (١٩٩٩).

بعد ذلك كان غزو نباتات البطاطس البكتيرية معتدلا (٤%). بسبب ضرورة قيام المزارعين باستخدام مبيدات حشرية لمكافحة الآفات الآخري كان الخفض في استخدام

المبيدات قليل نسبياً. لقد بلغ متوسط الخفض في مزارع البطاطس البكتيرية رشّة واحدة أقل من الرشّات التي استخدمها مزارعي البطاطس العادية. القبول الحديث للبطاطس المقاومة لكلا خنفساء كلورادو البطاطس والفيروسات النباتية. ادي الي التصريح من قبل مسؤولي وكالة البيئة الامريكية USEPA بتوقعاتهم بان الاستخدام الواسع لهذا المنتج لابد وان تقلل الاستخدام الحالي الجاري للمبيدات الحشرية التي تكافح المن الناقل لفيروس البطاطس (جيانسي وكارينتر ١٩٩٩). النباتات التي تعول وتضاعف بكتريا Bt تزود المزارعين بحماية ذاتية ضد الافات "built in" مما يخفض بشكل كبير الحاجة الي نقل وخط استخدام والتخلص من المبيدات الكيميائية التي تستخدم علي النباتات في الخارج. لقد امكن عن طريق هذا الاقتراب تقليل مخاطر الاستخدام الخاطي والتوقيت غير المناسب وتعرض العمال للمبيدات. بالطبع وبسبب ان الكراي بروتين لا يمكن تحقيق الوقاية ضد كل الافات فان استخدامات اضافية من المبيدات قد تكون مطلوبة علي النباتات البكتيرية لمكافحة الافات التي لا يمكن للكراي بروتين المنتج مكافحتها.

المكافحة العالية للافات: معظم يرقات ثاقبات الذرة الاوربية والجنوب غربية والتي تحاول التغذية علي نباتات الذرة البكتيرية Bt-protected corn تكون قادرة فقط علي عمل خدوش قليلة علي ورقة الذرة ثم تموت خلال ٧٢ ساعة. هجن الذرة البكتيري تعبر عن بروتين الكراي في كل اجزاء النباتات خلال الموسم ومن ثم تحقق ١٠٠% حماية من الاصابة بثاقبات الذرة. لقد اظهر الحصر الذي اجراه Wein Zierl وآخرون (١٩٩٧) ان حشرتان فقط من ثاقبات الذرة وجدت في مساحة ٣,٥ اكر في الصنف yield-gard عام ١٩٩٨. نباتات القطن المهندسة بالبكتريا Bt تقدم مكافحة فعالة لدونتي براعم الدخان واللوز القرنفلية. لقد تراوحت الفاعلية من ٧٠ الي ٩٠% علي هذه الافات (جدول ٨-٧). الاعمار من الاول للاربع من هذه الحشرات وجدت حساسة جدا للكراي بروتين بينما الاعمار الخامس قلت حساسيتها بشكل كبير لهذه المركبات (Halcomb وآخرون ١٩٩٦). لقد امكن حماية نباتات البطاطس علي طول الموسم ضد كل اطوار خنفساء الكلورادو حيث لم تكن هناك حاجة لاي معاملات اضافية بمبيدات حشرية اخري لمكافحة هذه الافة علي البطاطس.

جدول (٨-٧): النسبة المئوية لافات القطن الحشرية التي قتلت بواسطة القطن المهندس وراثيا بيكتريا Bt في القطع التجريبية.

| الافات | النسبة المئوية للمكافحة |
|-------------------------------|-------------------------|
| دودة براعم الدخان | ٩٥ |
| دودة اللوز القرنفلية | ٩٩ |
| ديدان لوز القطن (بل التزهير) | ٩٠ |
| ديدان لوز القطن (بعد التزهير) | ٧٠ |

الانتاجية المحصولية العالية: حماية المحاصيل بالبكتريا تترجم الي زيادة معنوية في الانتاجية المحصولية. يتفاوت الفقد السنوي المحصولي بسبب الاصابة بثاقبة الذرة الاوربية بشكل عريض حيث تراوح من ٣٣ وحتى ٣٠٠ مليون بوشل لكل سنة (US DA ١٩٧٥). في عام ١٩٩٧ تم زراعة الذرة البكتيري Bt في مساحة ٤ مليون اكر وكانت الاصابة بدودة الذرة الاوربية قليلة. في هذه السنة حقق الذرة البكتيري محصول اولي ١٢ بوشل/اكر. بعد سنة واحدة كانت الاصابة بهذه الحشرة خفيفة جدا مما ادي الي زراعة الذرة البكتيري في مساحة ٢٤ مليون اكر. حينئذ اصبح الفلاحين الذين يزرعون ذرة الباسيلليس يحققون زيادة في الانتاجية المحصولية تساوي ٤,٣ بوشل/اكر او زيادة كلية ٦٠ مليون بوشل. في عام ١٩٩٥ كان متوسط الفقد في المحصول بسبب ديدان البراعم واللوز وقبل ادخال القطن البكتيري تصل الي حوالي ٤% في مقابل فقد ٢٩% في ولاية الاباما. بعد ثلاثة سنوات وصلت مساحات القطن البكتيري ١٧% من اجمالي مساحة القطن في امريكا وما يزيد عن ٥٠% من القطن النامي في الاباما. خفض التلف والضرر في هذه المساحة ادي الي زيادة المحصول الكلي للقطن الشعر بمقدار ٨٥ مليون رطل. بناء علي الاحصائيات تحقق ٤٠ دولار لكل اكر صافي عائد زيادة في امريكا. لقد اتضح ان الفلاحين الذين يزرعون القطن البكتيري حققوا فوائد صافية اكثر من ٩٢ مليون دولار في عام ١٩٩٨. اوضح James (١٩٩٩) ان القطن البكتيري والذرة Bt في امريكا وكندا حققنا زيادة في العائدات بسبب السيطرة علي الافات مقدارها ١٣٣ ، ١٢٤ مليون دولار علي التوالي عام ١٩٩٧ في مقابل زيادة ١٩٠,١ مليون دولار علي مستوي العالم في نفس السنة. حتي الان لم تتحقق زيادة معنوية في انتاجية البطاطس البكتيرية.

مكافحة اضافية للافات بواسطة الكائنات النافعة: الكراي بروتينات بشكل عام لها تاثير قليل او ليس لها تاثير ضار علي المفترسات والطفيليات الحشرية الطبيعية كما اتضح من الدراسات المعملية والحقلية مع خنافس ابي العيد والبق والدبابير والقمل المجنح الاخضر

وغيرها من مفصليات الأرجل. هذا يسمح ببقاء الكائنات النافعة في زراعات النباتات المهندسة ببكتريا الباسيلليس Bt حيث يمكن ان تساهم في السيطرة ومكافحة الافات الثانوية والتي قد تصبح مشكلة في حالة خفض تعداد الطفيليات والمفترسات من جراء استخدام المبيدات الحشرية التقليدية. لقد لاحظ Reed وآخرون ١٩٩٣ ان مفصليات الأرجل النافعة وحدها سيطرت على الاصابة بحشرات المن لاقل من مستوي الضرر في حقول البطاطس من الصنف المقاوم بتوليف بلس والتي لم تعامل بالمبيدات لمكافحة المن حيث كانت الحشرات النافعة والعناكب منتشرة بكثرة. في هذه الحقول. هذا يعني ان الحشرات النافعة حققت فائدة كبيرة في منع الانتشار الوبائي للعنكبوت الاحمر. على نفس المنوال فان استخدام القطن البكتيري في الصين مع تقليل استخدام المبيدات الحشرية حقق زيادة في متوسط اعداد المفترسات بمقدار ٢٤% عما هو الحال في حقول القطن التقليدية (Xia وآخرون ١٩٩٩). مع التسليم بان المحاصيل البكتيرية تتطلب استخدامات قليلة من المبيدات الحشرية فان مجاميع الكائنات النافعة تكون اكثر حماية مما يؤدي الي اقل تلف في المحصول والحاجة لقليل من تطبيقات المبيدات واحتمالات كبيرة لزيادة الانتاجية.

خفض مستويات التوكسينات الفطرية: ثاقبات الذرة التي تتغذى على العيدان وانسجة الكيزان تسبب تلف للحبوب النامية مما يمكن الجراثيم للفطريات المنتجة للتوكسينات من انواع الفيوزاريوم من الانتبات. يحدث انبات للجراثيم وتضاعف للفطر مما يسبب عفن في الكيزان والحبوب مع انتاج زائد من عائلة الميكوتوكسينات Fumonisin. الفيومونيزين عبارة عن توكسينات فطرية تحدث الموت والشلل في الاحصنه والنعام (Norred ١٩٩٣) كما ان لها ارتباط بالحالات الوبائية لسرطان المرئ والكبد في فلاحى افريقيا (Marasas وآخرون ١٩٨٨). بسبب ان الكراي بروتين Ab 1 يقلل او يمنع التلف في الانسجة التي تحدث ثاقبات الذرة في نباتات الذرة والتي تنتج بروتين الكراي 1Ab في النبات تكون جراثيم الفطر اقل قدرة على الانتبات والتكاثر. لقد اوضح Munkuold وآخرون (١٩٩٧) ، (١٩٩٩) ان مستويات عفن الكيزان الفيوزاريومي والمستويات السامة من السم الميكوتوكسين فيومونيزين انخفضت في شكل درامي كبير في نباتات الذرة البكتيرية مقارنة بالنبات غير البكتيرية كما لوحظ خلال سنوات طويلة. اظهرت نتائج البحوث التي اجريت في جامعة ايوا ووزارة الزراعة الامريكية حدوث خفض حتى ٩٦% في مستويات اعفان الكيزان الفيوزاريومية في الكيزان التالفة بالحشرات مع هجن الذرة البكتيرية بالمقارنة بالهجن العادية. في نفس السنة أي عام ١٩٩٧ وهى السنة التي حدثت فيها اصابات عالية ثاقبة الذرة اتضح حدوث خفض ٩٠-٩٣% في مستويات الفيومونيزين. لقد استنتج

Munkuold وآخرون (١٩٩٧) أن الهندسة الوراثية للذرة لجعلها مقاومة للحشرات قد يزيد من أمانة علي الحيوانات والإنسان. قيمة الفروق في تركيزات الفيومونيزين بين النباتات المهندسة وراثيا والعادية وجدت كافية لحدوث السمية من حبوب الذرة علي المزارع الخلوية الأدمية. لقد لوحظ نفس الفقد (٩٠%) تقريبا في مستويات الفيومونيزين في الذرة البكتيري النامي في إيطاليا. أن مستويات خفض الفيومونيزين تعتمد علي الاختلافات البيئية وبين الأصناف لا يوجد معلومات كافية عن تأثير الذرة البكتيري علي الميكوتوكسينات الأخرى مثل الأفلاتوكسينات. يبدو أن مستويات الأفلاتوكسينات متباينة لحد كبير مع عدم وجود أدلة تشير الي ارتباط ثابت بينها وبين وجود بكتريا الباسيلليس Bt.

اعتبارات الأمان في النباتات المهندسة وراثيا ببكتريا الباسيلليس Bt:

- المنتجات الميكروبية الباسيلية Bt من أكثر المبيدات الحيوية استخداما في العالم وقد احتلت ١-٢% من السوق العالمي للمبيدات الحشرية في التسعينات (Baum وآخرون ١٩٩٩). الكراي بروتينات ذات تخصص عالي للآفات الحشرية المستهدفة حيث قد يكون تأثير قليل أو تكون عديمة التأثير علي الكائنات الأخرى. علي امتداد ٤٠ عاما من الاستخدام العالمي لم تحدث المنتجات الميكروبية Bt إيه تأثيرات معاكسة علي صحة الإنسان والبيئة. منذ بداية تسجيل هذه المنتجات في أمريكا منذ ١٩٦١ يوجد الآن تسجيلات جارية علي الأقل ١٨٠ منتج بكتيري (EPA ١٩٩٨ - ب) في أمريكا في مقابل ما يزيد عن ١٢٠ منتج ميكروبي في دول الاتحاد الأوروبي. لقد استخدمت وما زالت هذه المركبات مستمرة في الاستخدامات الزراعية وفي مكافحة ناقلات الأمراض. لقد قدرت وكالة EPA اجراء العديد من الدراسات التوكسيكولوجية علي منتجات الباسيلليس واتضح عدم حدوث تأثيرات معاكسة مما دعي الي الاستنتاج بأن هذه المركبات غير سامة أو ممرضة للإنسان (EPA ١٩٩٨ - أ). في إصدارات متطلبات التسجيل للمبيدات من قبل الوكالة أشارت الوثائق أن منتجات الباسيلليس ليس لها تأثيرات معاكسة غير معقولة علي الإنسان أو البيئة وكل استخدامات هذه المنتجات مؤهلة أو جديرة بالتسجيل. لقد أشار تقدير الأمان الكيميائي في البرنامج الدولي التابع لمنظمة الصحة العالمية (WHO) أن بكتريا الباسيلليس Bt ومنسجاتها لم تسبب إيه تأثيرات معاكسة علي صحة الإنسان عندما توجد في مياه الشرب أو الطعام (IPCS ٢٠٠٠).

- تستخدم مستحضرات Bt علي نطاق تجاري في الولايات المتحدة الامريكية وكندا والمكسيك وغيرها من دول امريكا الجنوبية وفي كل دول الاتحاد الاوربي. كذلك يشيع استخدام هذه المنتجات في العديد من الدول الاخرى مثل روسيا والصين واستراليا ودول اوربا الشرقية. لقد استعرضت هيئة الصحة العالمية WHO حديثا قاعدة بيانات عن الامان العالي لهذه المستحضرات البكتيرية Bt وخلصت الي : بسبب الكيفية الخاصة لاحداث الفعل فان منتجات بكتريا Bt لا تسبب اية اضرار علي الانسان او غيره من الفقاريات ولحد كبير الفقاريات غير المستهدفة حيث وجدت خالية تماما من البكتريا باسيلليس والمنتجات الفعالة بيولوجيا بخلاف البروتينات التي تكافح الحشرات ICPS (IPCS ٢٠٠٠). البيانات التالية والاسباب العلمية تعضد الامان البيئي وعلي صحة الانسان من خلال تجارب تقييم امان الكراي بروتينات:
- ♣ نتائج دراسات السمية الحادة عن طريق الفم او الغذاء اشارت الي ان العديد من المنتجات الميكروبية لبكتريا الباسيلليس التي تحتوي علي مخاليط مختلفة من الكراي بروتينات لم تظهر أي سمية علي الثدييات.
- ♣ الدراسات علي البروتينات الممثلة من ثلاثة اقسام للكراي بروتينات (كراي ١،٢،٣) اكدت ان هذه المواد غير سامة علي الثدييات عندما تعامل عن طريق الفم بجرعات عالية. كل البروتينات من اقسام الكراي بروتينات هذه تنهار بسرعة في سائل المعدة.
- ♣ الكراي بروتينات المحورة وراثيا (الكراي بروتينات التي لم تحدث فيها التغيرات بالطرق الجزيئية) لم تحدث اية تاثيرات صحية مميزة عندما تؤخذ عن طريق الفم. البيانات عن الكراي بروتينات التي تحدث طبيعيا تنطبق علي الكراي بروتينات الاصلية والمحورة وراثيا التي تنتج في النباتات المحمية ضد الحشرات.
- ♣ الكراي بروتينات ذات طريقة فعل معقدة وعالية التخصص. بالاضافة الي ذلك توجد مواقع ارتباط خاصة في اللافقاريات المستهدفة وتتطلب ان يحدث الكراي بروتين النشاط الالاسدي ضد الحشرات. التحليل المناعي الخلوي الكيميائي للكراي 1A immunocytochemical analysis لم يظهر وجود مواقع ارتباط مقارنة في الثدييات او في الحشرات التي لا تتأثر بهذه البروتينات.

• المنتجات الميكروبية الباسيلية Bt ذات تاريخ طويل (٤٠ سنة تقريبا) من الاستخدام الآمن. يوجد تقريرين فقط اشارا الي التأثيرات المعاكسة المؤثرة في الانسان من جراء استخدام المنتجات الميكروبية Bt واي منهما لم يشير الي التعرض للكراي بروتينات (EPA ١٩٨٨-١ ، Mc chintock وآخرون ١٩٩٥).

Human health implications التأثيرات الضارة علي صحة الانسان

المبيدات الميكروبية الباسيلية Bt غير سامة علي الثدييات. العديد من الدراسات الخاصة بالامان علي الحيوانات والتي اجريت علي مدي اربعين سنة اظهرت ان مخاليط المبيدات الحشرية الميكروبية Bt التي تحتوي علي بروتينات غير سامة عندما تتغذي عليها الثدييات. الدراسات التوكسيكولوجية التي سلمت الي وكالة حماية البيئة الامريكية EPA لتعصيد تسجيل تحت انواع الباسيلليس ثورينجنسيس فشلت في اظهار ايه تأثيرات معاكسة معنوية في زيادة وزن الجسم او الملاحظات السريرية او في الانسجة. بشمول اكبر وجد ان هذه الدراسات اكدت غياب السمية الحادة وتحت الحادة والمزمنة عن طريق الفم ترتبط بالمبيدات الميكروبية (جدول ٨-٨) هذه النتائج وثيقة الصلة ببيانات تقويم امان النبات المهندسة وراثيا ببكتريا الباسيلليس لان التحضيرات الميكروبية تحتوي علي نفس اقسام الكراي بروتينات (كراي ١ ، ٢ ، ٣) والتي ادخلت وهندست في النباتات المحمية ضد الحشرات (جدول ٨-٩).

• اظهرت دراسات السمية الحادة عن طريق الفم التي اجريت علي الجرذان والارانب عدم حدوث وفيات مع الجرعات العالية المختبرة والتي تتراوح من عدة الاف من المليجرامات من المنتج الميكروبي Bt لكل كيلوجرام من وزن الجسم (الجدول ٨-٨) الدراسات المذكورة في هذا الجدول لا تظهر ايه تأثيرات ضارة في الحيوانات استنادا لعدم حدوث موت او تغيرات في وزن الجسم واستهلاك الغذاء وكذلك عدم ظهور ايه اعراض مرضية شاملة. اظهرت الدراسات الخاصة بالسمية تحت المزمنة في الجرذان ان المستويات عديمة التأثيرات "no effect levels" وصلت حتي ٨٤٠٠ مللجم Bt منتج ميكروبي لكل كيلوجرام من وزن الجسم/يوم. في دراسات التغذية المزمنة لمدة سنتان في الجرذان لم يلاحظ اي نقص في وزن الجسم المكتسب في الاناث التي جرعت جرعة ٨٤٠٠ مللجم/كجم/يوم. في غياب

التأثيرات المعاكسة الأخرى لم تؤخذ هذه التأثيرات على أنها ذات أهمية من الناحية التوكسيكولوجية كما أن الجرعة ٨٤٠٠ ملجم/كجم/يوم اعتبرت هي المستوى عديم التأثير الملحوظ NOEL (McClintock وآخرون ١٩٩٥). في دراستان مستقلتان تم تغذية المتطوعين الادميين ١٠٠٠ ملجم من تجهيزات Bt الميكروبية كل يوم على امتداد خمسة أيام ولم تظهر عليهم أية أعراض سمية أو أية تأثيرات مرضية (جدول ٨-٨). تجهيزات الباسيلليس Bt التي استخدمت في دراسات تغذية الادميين كانت تحتوي على جينات تشفر عائلات الكراي بروتينات التالية: كراي 1Aa ، كراي 1Ab ، كراي 1B ، كراي 2A.

- لقد احتوت وثائق دلائل الوكالة EPA لاعادة تسجيل مستحضرات Bt الميكروبية وغيرها من الدراسات المرجعية على مراجع اضافية عن دراسات توكسيكولوجية على الثدييات والتي تم فيها معاملة مستحضرات Bt عبر واحد من الطرق والمداخل من التعرض بخلاف الفمي nonoral مثل التعرض الرئوي او الجلدي او عن طريق العيون او الحقن الوريثوني. لقد اجريت هذه الدراسات لتقويم القدرة المرضية/العدوي لبكتريا Bt في المستحضرات الميكروبية. لقد اعتبرت هذه الدراسات كذلك كمعايير للجودة للتأكد من عدم وجود توكسينات البروتينات غير الكراي (مثل الاكسوتوكسينات) والتي يمكن ان تنتج في بعض سلالات الميكروبات Bt. عندما عوملت جرعات كبيرة (١٠^٦ CFUS) من الكائنات الدقيقة الباسيلية Bt عن طريق الحقن في القوارض اوضحت بعض من التقارير حدوث وفيات في حيوانات التجارب في بعض الظروف. لقد لوحظ الموت كذلك في القوارض التي تم حفظها بنفس الجرعات الكبيرة من البكتريا غير المرضية مثل الباسيلليس سبتيلليس. حيث ان الموت قد يحدث بعد حقن الجرعات الكبيرة من الكائنات الدقيقة غير المرضية فان الموت الذي حدث في القوارض التي اعطيت جرعات كبيرة من ميكروبات Bt لا ترجع الي الكراي بروتينات الموجودة في مستحضرات Bt الميكروبية (EPA ١٩٩٨-١). نتائج دراسات الحقن والحساسية لم تذكر في هذا المقام لانها غير وثيقة الصلة بتقويم المخاطر الصحية المؤثرة بسبب التعرض الغذائي للكراي بروتينات التي تنتج في النباتات.

جدول (٨-٨): تقييم سمية الباسيلليس ثورينجينسيس على الثدييات - المبيدات الحشرية الميكروبية (التعرض عن طريق الفم)

| Mammalian Toxicity Assessment of <i>Bacillus thuringiensis</i> —Microbial Pesticides (Oral Exposure)* | | | | | | |
|---|---|----------------|---|---|---|--|
| Bt Microbial | Cry gene content | Test substance | Type of study | Results (NOEL) ^a | Toxicity findings | Reference |
| <i>Kurstaki</i> (Crymax) | Cry1Ac Cry2A Cry1C | Technical | Acute oral toxicity/pathogenicity (rat) | >2.5-2.8 × 10 ⁸ CFUs/rat | No evidence of toxicity | Carter and Liggett (1994) and EPA Fact Sheet (1996a) (Ecogen) |
| <i>Kurstaki</i> (Lepinox) | Cry1Aa Cry1Ac Cry3Ba | Technical | Acute oral toxicity/pathogenicity (rat) | >1.19 × 10 ⁸ CFUs/rat | No evidence of toxicity | Barbera (1995) |
| <i>Kurstaki</i> (Raven) | Cry1Ac Cry3Aa Cry3Ba | Technical | Acute oral toxicity/pathogenicity (rat) | >4 × 10 ⁸ CFUs/rat | No evidence of toxicity | Carter <i>et al.</i> (1993) |
| <i>Kurstaki</i> (Cutlass) | Cry1Aa Cry1Ab Cry1Ac Cry2A Cry2Ab Cry3Aa | Technical | Acute oral toxicity/pathogenicity (rat) | >10 ⁸ CFUs/ml, dosing rate is 1 ml/rat | No evidence of toxicity | David (1988) |
| <i>Tenebrionis</i> (Sun Diego) | Cry3Aa | Technical | Acute oral toxicity (rat) | >5050 mg/kg | No evidence of toxicity | EPA Fact Sheet (1991) (Mycogen) |
| <i>Kurstaki</i> (Dipel) | Cry1Aa Cry1Ab Cry1Ac Cry2Aa | Technical | Acute oral (rat) | ≥4.7 × 10 ¹¹ spores/kg | No evidence of toxicity | EPA Fact Sheet (1986) (Abbott) and McClintock <i>et al.</i> (1995) |
| <i>Kurstaki</i> (Dipel) | Cry1Aa Cry1Ab Cry1Ac Cry2Aa | Technical | 13-week oral—(gavage) (rat) | >1.3 × 10 ⁹ spores/kg | No evidence of toxicity | McClintock <i>et al.</i> (1995) |
| <i>Kurstaki</i> (Dipel) | Cry1Aa Cry1Ab Cry1Ac Cry2Aa | Technical | 13-week oral—(feed) (rat) | >8400 mg/kg/day | No evidence of toxicity | McClintock <i>et al.</i> (1995) |
| <i>Kurstaki</i> (Dipel) | Cry1Aa Cry1Ab Cry1Ac Cry2A | Technical | 2-year chronic—rat (feed) | 8400 mg/kg/day | Statistically significantly decreased body weight gain in females from week 10 to week 104 (not considered related to Cry proteins); no infectivity/pathogenicity was found. | McClintock <i>et al.</i> (1995) |
| <i>Kurstaki</i> | Cry1Aa Cry1Ab Cry1Ac Cry2Aa | Technical | Human—oral | 1000 mg/adult or 1 × 10 ¹⁰ spores daily for 3 days | No toxicity/infectivity; all blood cultures were negative; 5 of 10 patients showed viable <i>Bt</i> microbes in stool samples 30 days postfeeding. | EPA Fact Sheet (1986) (Abbott) and McClintock <i>et al.</i> (1995) |
| <i>Berliner</i> | Cry1Ab Cry1B | Technical | 5-day human oral exposure | 1000 mg/adult or 3 × 10 ⁹ spores in capsules daily for 5 days ^a | All subjects remained well during the course of the experiment (~5 weeks) and all laboratory findings were negative (subjects were evaluated before treatment, after the 5-day treatment period, and 4 to 5 weeks posttreatment). | Fisher and Rosner (1959) |
| <i>Israelensis</i> (Teknar) | Cry4A Cry4B Cry10A Cry11A Cyt1Aa | Technical | Acute oral toxicity/infectivity (rat) | >1.2 × 10 ¹¹ spores/kg | No evidence of toxicity | McClintock <i>et al.</i> (1995) |
| <i>Israelensis</i> (h-14) | Cry4A Cry4B Cry10A Cry11A Cyt1Aa | Technical | 13-week oral (feed) rat | >4000 mg/kg/day | No evidence of toxicity | McClintock <i>et al.</i> (1995) |

* Doses are expressed in various units for *Bt* microbial technical-grade materials, e.g., mg technical ingredient/kg body wt. or more commonly CFUs or spores/animal or kg body wt. For purposes of comparison with Table 8, it would have been desirable to convert all doses into mg/kg units. Unfortunately, this is not possible since the colony forming units (CFUs) or spore count can range from approximately 10⁸ to 10¹¹ per gram of technical-grade *Bt* microbial material (McClintock *et al.*, 1995). Second, the Cry protein content in different *Bt* microbial preparations may vary depending on the microorganism and fermentation conditions. It is possible to conclude from Table 7 that the Cry2 protein dosages administered to animals in the referenced studies ranges from milligrams to grams/kg body wt.

^a Highest dose in the toxicity study that produced no adverse effects. In all referenced studies, the highest tested dose produced no test article related adverse effects.

جدول (٨-٩): سمية الكراي بروتينات للباسيليس ثورينجينسيسز علي الثدييات المعبر عنها في النسبئات: حساب حدود التعرض الغذائي (NOEL في دراسات الحيوانات/مستويات تعرض الانسان)

Mammalian Toxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry Proteins* Expressed in Crops: Calculated Dietary Exposure Margins (NOEL Animal Study/Human Exposure Levels)

| Cry protein | Type of study | Results (NOEL)* mg/kg/day | Toxicity findings | Dietary exposure margin* | Reference |
|-------------|---------------------------------------|------------------------------|--|--|--|
| CryIAb | Acute oral toxicity (mouse) | >4000 | No evidence of toxicity | >22,000,000 (corn) | EPA Fact Sheet (1996b) (Monsanto) |
| CryIAb | Acute oral toxicity (mouse) | >3280 | No evidence of toxicity | >3,000,000,000 (corn) | EPA Fact Sheet (1995a) (Ciba Seeds) |
| CryIAb | 28-day mouse drinking water study | >0.45 via drinking water | No evidence of toxicity, no evidence of immunological responses | >20,000 (tomato) | Noteborn <i>et al.</i> (1994) |
| CryIAb | 31-day rabbit drinking water study | >0.06 via drinking water | No evidence of toxicity | >2800 (tomato) | Noteborn <i>et al.</i> (1994) |
| CryIAc | Acute oral toxicity (mouse) | >4200 | No evidence of toxicity | >22,000,000 (cottonseed oil) >18,000,000 (tomato) | EPA Fact Sheet (1995c) (Monsanto) |
| CryIAc | Acute oral toxicity (mouse) | >5000 | No evidence of toxicity | >560,000,000 (corn) | Spencer <i>et al.</i> (1996) (Dekalb) |
| Cry2Aa | Acute oral toxicity (mouse) | >4011 | No evidence of toxicity | >1,000,000,000 (cottonseed oil) | Monsanto, unpublished |
| Cry2Ab | Acute oral toxicity (mouse) | >1450 | No evidence of toxicity | 2,800,000 (corn) | Monsanto, unpublished |
| Cry3A | Acute oral toxicity (mouse) | >5220 | No evidence of toxicity | >652,500 (potato) | EPA Fact Sheet (1995b) (Monsanto) |
| Cry3Bb | Acute oral toxicity (mouse) | >3780 | No evidence of toxicity | >291,000 (corn) | Monsanto, unpublished |

(١) علي عكس جدول (٨-٨) ثم اختبار الكراي بروتينات فردية وليست علي صورة مخاليط.

(٢) اعلي جرعة في دراسة السمية لا تنتج تاثيرات معاكسة. في كل الدراسات المرجعية اخذت اعلي جرعات لا تنتج تاثيرات معاكسة.

(٣) حساب مدي التعرض

دراسة سمية NOEL (ميكروجرام / كجم وزن جسم/يوم)

مدي التعرض =

الاستهلاك الادمي للكراي بروتين (ميكروجرام/كجم وزن/يوم)

الاستهلاك الادمي للغذاء (جم/يوم) × تركيز الكراي

بروتين

الاستهلاك الكراي بروتين =

(ميكروجرام/وزن جسم/يوم)

متوسط وزن الجسم الادمي (٦٠ كيلوجرام)

حسابات الاستهلاك افترضت عدم حدوث فقد في الكراي بروتين خلال تجهيز الغذاء. قيم الاستهلاك الادمي للغذاء تحصل عليه من قاعدة البيانات USDA TAS (1993 USDA) GEMS / FRD (WHO 1998). المحاصيل بين الاقواس يشير الي المحصول الذي يتم فيه انتاج الكراي بروتين بناء علي ما نشر ووفق عليه من قبل وكالة حماية البيئة الامريكية EPA.

متطلبات اختبار الامان لتسجيل منتجات البكتريا Bt كانت محط الاعتبار طوال السنوات مع استكمال الدراسات الخاصة بالسمية/المرضية في اعوام 1982، 1989 ومرة اخري في 1998 (EPA 1998 أ، ب). بينما اجريت دراسات الامان تحت المزملة والمزملة مع ظهور اول منتجات ميكروبية باسيللية فان الوكالة EPA قدرت ان التقويم للاضرار الحادة acute hazard assessment كافية لتقويم امان المنتجات الميكروبية Bt الجديدة. لقد بني هذا القرار علي حقيقة ان الكراي بروتينات في منتجات بكتريا Bt تعمل من خلال التقنيات الحادة لمكافحة الافات الحشرية وهذه التقنيات لا تعمل في الانسان. لقد اعتبرت بطاريه من دراسات السمية الحادة/المرضية كافية من قبل الوكالة لاجراء تقويم المخاطر للمبيدات الميكروبية. بالاضافة الي ذلك اتفق علي ان الدلتا-اندوتوكسينات للباسيلليس Bt تؤثر علي الحشرات من خلال تقنية معروفة جيدا حيث ترتبط بمواقع متميزة علي مستقبل متميز علي غشاء الخلية في معدة الحشرة ومن ثم تكون نقوب واحداث خلل في التوازن الاسموزي ليس معروفا وجود مواقع استقبال متماثلة في انواع الثدييات يمكن ان تتاثر بصرف النظر عن عمر الفرد. لذلك توجد تأكيدات مقنعة بعدم احتمالات احداث اضرار علي الرضع والمواليد والاجنة من جراء التعرض الغذائي لمخلفات Bt.

⑤ الكراي بروتينات التي تنتج في النباتات المهندسة وراثيا ببكتريا Bt غير سامة علي الثدييات.

لتقويم امان الكراي بروتينات المعبر عنها في النباتات فان اختبار السمية الحادة مع اختبارات السلوك الهضمي خارج الحيوان تعتبر مناسبة وكافية لتقويم المخاطر الصحية من جراء التعرض الغذائي للكراي بروتينات (Sjoblad وآخرون 1992). اختبارات احداث المرضية والعنوي والتي تجري علي المادة الفعالة الخام من ميكروب Bt الحي تعتبر غير مناسبة لاختبارات الكراي بروتينات. اختبارات التعرض الجلدي او عن طريق الاعين او الاستنشاق في العادة غير مناسبة حيث ان تعرض العمال للكراي بروتينات المعبرة عنها

في النباتات يعتبر في حيز الاهمال أي غير ذات قيمة او موضوع. في النباتات يعبر عن الكراي بروتينات بمستويات منخفضة (جزء في المليون) ويوجد داخل خلايا النباتات. جميع اختبارات السمية علي الثدييات لافراد الكراي بروتينات التي يعبر عنها في النباتات المحمية بالباسيليس اظهرت عدم حدوث أي نوع من السمية. لم تلاحظ ايه ارتباطات بين المعاملة والتاثيرات المعاكسة في أي من دراسات السمية الحادة علي الثدييات عن طريق الفم التي اجريت علي الكراي ١ ، الكراي ٢ ، الكراي ٣ من البروتينات (جدول ٨-٩). المستويات عديمة التأثير الملحوظ NOELs لهذه الكراي بروتينات تتراوح حتي ٥٢٢٠ ملجم/كجم. مستويات التعرض هذه التي لا تنتج سمية تتراوح من الالف وحتى ملايين المرات اعلي من لتعرض الغذائي لهذه البروتينات (جدول ٨-٩). مثال ذلك فان مستوي تعبير Cry1Ab في حبوب الذرة تقارب من واحد جزء في المليون. الفرد بوزن ٦٠ كجم يجب ان ياكل ١٢٠.٠٠٠ كجم/يوم من حبوب الذرة كي يتحقق نفس التأثير الحاد للجرعة العالية ٤.٠٠٠ ملجم/كجم في بروتين Cry1Ab الذي لا ينتج تاثيرات معاكسة عندما تتغذي علي الفئران (جدول ٨-٩). بناء علي نقص التاثيرات السامة والحدود الكبيرة للامان للتعرض الغذائي تم استنتاج ان هذه الكراي بروتينات لا تملك ايه مقومات لاحداث مخاطر علي صحة الانسان والحيوان.

⊕ الكراي بروتينات عالية التخصص Highly specific:

الثدييات ومعظم الانواع الاخرى ليست حساس للكراي بروتينات. لقد تم تفسير ذلك جزئيا من خلال الحقيقة ان الظروف المطلوبة لحدوث الخطوات المعقدة في احداث الفعل كما ذكرت بواسطة English and Slatin (١٩٩٢) لا توجد في الثدييات او معظم اللافقاريات. الكراي بروتينات يجب ان تكون بداية. القسم الكراي ١- من الكراي بروتينات يتطلب وسط قلوي كي يكون مع درجة حموضة عشرة او اعلي حتي يكون الذوبان جيد. مع درجة حموضة ١,٢ في القناة الجوفمعية في الانسان فان الكراي بروتينات ذات محدودية شديدة في الذوبان. بعض الكراي بروتينات يجب ان تهضم مع التحلل البروتيني الي الصورة الفعالة في اباد الحشرات. الكراي بروتينات يجب ان تبقى فعالة بدرجة تفوق الاعتبار. اظهرت العديد من التجارب ان الكراي بروتينات تنهار بسرعة تحت الظروف التي تحاكي ظروف الجوفمعية في نظم الثدييات. لذلك فان هذه الكراي بروتينات تنهار بسرعة وتفقد فاعليتها بمجرد الاستهلاك. في النهاية فان الارتباط علي المستقبل في الغشاء الطرفي في الخلايا الطلائية للمعي الاوسط يؤدي الي صورة مرتبطة

علي بروتينات مستقبل المعى الاوسط الجزئ في طرف فرشاة الغشاء ، وفي النهاية تكوين قنوات وتقوب.

الارتباط علي هذه المستقبلات مطلوب حتي يحدث الكراي بروتين أي فاعلية ونشاط. اذا لم يحدث الارتباط علي المستقبل فان الكراي بروتين يكون عديم الفاعلية علي الكائن الحي. تحصل الباحث Noteborn وآخرون (١٩٩٣) علي عدم حدوث ارتباط متخصص للكراي 1Ab بروتين علي نسيج القناة الجوفمعية داخل جسم الجرذان والفئران. لقد طور هؤلاء الباحث طريقة تحليل مناعية خلوية كيميائية في خارج جسم الحيوان (للكشف عن ارتباط الكراي بروتين في خلايا الحشرة) لتقييم ارتباط بروتين Cry1Ab في قطاعات نسيج معدة الثدييات. تحليل قطاعات أنسجة الجرذان والفئران والقردة والانسان لم يظهر اية مواقع ارتباط الكراي 1Ab في هذه الأنسجة. لقد تعضد هذه النتيجة لدراسات هوفمان وآخرون (١٩٨٨) حيث لم يتمكنوا من الكشف عن ارتباط متخصص للكراي بروتين علي تجهيزات الأغشية الخلوية لامعاء الجرذان. لقد حدث تعضد اضافي للامان الغذائي للكراي بروتينات علي الانسان والحيوانات بناء علي النتائج السابقة بسبب:

- (١) نقص الظروف المناسبة لاذابة الكراي بروتينات.
- (٢) اعتبار الكراي بروتينات بمجرد التناول والاستهلاك.
- (٣) نقص المستقبلات المتخصصة للكراي والمطلوبة لاحداث الفاعلية.

⊙ الكراي بروتينات تهضم بسرعة Rapidly digested:

لقد اتضح ان الكراي ١ ، ٢ ، ٣ بروتينات تتهار بسرعة خارج الكائن الحي in vitro مع استخدام سوائل تماثل تلك الموجودة في المعدة. اظهرت نتائج التحليلات السبعة خارج الكائن الحي والتي اجريت علي بروتينات الكراي ١ ، ٢ ، ٣ حدوث انهيار سريع خلال ٣٠ ثانية في نماذج تحاكي ظروف الهضم (٨-١٠). الكراي بروتينات التي تتراوح في الحجم من ٦٠ - ١٣٠ kda تتهار في نماذج الهضم الي ببتيدات عديدة اقل من ٢ كيلو دالتون في الحجم والتي تترجم الي اقل من ١٠ احماض امينية في الطول وهو الحد الأدنى للفصل في تحليل ويسترن هذه النماذج خارج الجسم اقل استعمار من النظم الجوفمعية للانسان والحيوان مما دعي الي الاقتراح بان الكراي بروتينات تتهار بسرعة وبدرجة كبيرة بمجرد الاستهلاك الهضم السريع لاقسام الكراي ١ ، ٢ ، ٣ للبروتينات بعد التناول الغذائي يحد ويقلل من كفاءة البروتين في احداث أي تفاعل حساسية حيث ان درجة

الامتصاص مستقل بشكل كبير. المواد الغذائية المحدثّة للحساسية عادة تكون ثابتة في النموذج الجوفمعية بينما البروتينات الغذائية الشائعة التي لا يعرف عنها أحداث للحساسية تنهار بسرعة في السائل المماثل لسائل المعدة (Metcalfه وآخرون ١٩٩٦ ، Astwood وآخرون ١٩٩٦). بالإضافة إلى ذلك فإن هذه الكراي بروتينات في الطعام بمستويات قليلة للغاية تقلل لحد كبير درجة التعرض ومن ثم يقل الامتصاص. أظهرت الدراسات اللاحقة عن الحساسية عدم وجود هذه الظاهرة مع الكراي بروتينات ١ ، ٢ ، ٣ . على مدى الأربعين عاما منذ الاستخدام التجاري للمنتجات الميكروبية الباسيلية لم يثبت أو يظهر أية تأثيرات في أحداث الحساسية.

جدول (٨-١٠): هضم كراي بروتينات بكتريا Bt خارج الكائن الحي في سائل معدة محاكي.

| المصدر | مخرجات الهضم | نتيجة الهضم | كراي بروتين |
|-------------------------------------|--|----------------------|-------------|
| EPA Fact Sheet (1996b) (Monsanto) | تحول الي مركز مقاوم للثريسين | إنهيار خلال ٣٠ ثانية | Cry1Ab |
| EPA Fact Sheet (1995a) (Ciba Seeds) | إنهيار سريع في جو الببسين | إنهيار خلال دقيقة | Cry1Ab |
| Noteborn et al. (1994) | إنهيار جوهري من خلال الهضم | إنهيار جوهري | Cry1Ab |
| EPA Fact Sheet (1995c) (Monsanto) | تحول الي مركز مقاوم للثريسين | إنهيار خلال ٣٠ ثانية | Cry1Ac |
| Spencer et al. (1996) (Dekalb) | نقص تركيز الببسين ١١٠ مرة - حدث إنهيار لاقل من حدود التقدير خلال ٥ دقائق | إنهيار خلال ٣٠ ثانية | Cry1Ac |
| Monsanto, unpublished | تحول الي مركز مقاوم للثريسين | إنهيار خلال ٣٠ ثانية | Cry2Aa |
| EPA Fact Sheet (1995b) (Monsanto) | تحول الي مركز مقاوم للثريسين | إنهيار خلال ٣٠ ثانية | Cry3A |

⊕ الكراي بروتينات لمحورة ليس لها ايه نواحي او تأثيرات خاصة no unique

:concerns

الكراي بروتينات في النباتات المحمية وراثيا ببكتريا الباسيليس Bt تختلف قليلا ان لم تختلف علي الاطلاق عن اقرانها من الكراي بروتينات الطبيعية. بعض البروتينات التي تم التعبير عنها في النباتات متفرعة وتماثل البروتينات التي تحدث طبيعيا بعد ان تتكسر وتتقسم في معدة الحشرة بينما البعض الاخر قد يختلف عن البروتينات الطبيعية في القليل من الاحماض الامينية. لا يوجد سبب للتوقع بان هذه البروتينات المحورة وراثيا تملك اية تأثيرات علي صحة الانسان بالمقارنة بانواعها الطبيعية. في الحقيقة توجد ادلة ان الكراي بروتينات المحورة تخلق فعلا في الطبيعة. يبدو ان الكراي 1Ab اندوتوكسين يخلق من الدمج بين ancestral cry 1Aa وجينات التوكسين مماثل cry 1A6 (Geiser) واخرون (١٩٨٦). علي نفس المنوال فان تصنيف نتائج الحمض الاميني للكراي 1Ca ، 1Cb ، 1Ea ، 1Eb تلقي الضوء وتشير الي احتمال وجود موقع دمج قريب في الحمض الاميني

٤٥٠. لقد ادي تحليل هذا الاحتمال الي الاقتراح بان الدمج بين جينات الكراي القريبة تعتبر من العمليات العادية في نشوء جينات الكراي.

تحديد وتقرير امان الغذاء من المحاصيل المهندسة ببكتريا Bt:

لقد تم تقرير وتحديد امان النباتات المحمية وراثيا ببكتريا Bt والموجودة حاليا في الاسواق كغذاء للانسان او علف للحيوان. بالاضافة الي تقييم امان الكراي بروتينات فان الاجزاء التي تؤكل من المحاصيل والبروتينات العلامة للجين تم فحصها كذلك. لقد اتضح ان محاصيل الذرة والقطن والبطاطس المحمية ببكتريا Bt متكافئة لحد كبير (مقارنة في التركيب) مع اقارنها غير المهندسة ببكتريا Bt. لم تلاحظ اختلافات معنوية في تركيب المكونات مثل الحبوب والبذور والدرنات والزيت والقش او اية نواتج ثانوية اخري بين المحاصيل المهندسة وراثيا ببكتريا Bt و اقارنها غير البكتيرية (Sanders وآخرون ١٩٩٨). الاختلاف الوحيد يتمثل في ان النباتات الباسيلية تقدم حماية ضد بعض الافات من خلال التعبير عن كراي بروتين خاصة علي امتداد البروتين العلامة وكلاهما ثبت اما نهما للاستهلاك الادمي. تحليل الخصائص الزراعية والمورفولوجية للنباتات المحمية ببكتريا Bt تؤكد كفاءة وثبات الصفات المفروسة ونقص التأثيرات غير المقصودة بشكل كبير والتي قد ترجع الي عملية التحويل الوراثي. المحاصيل المحمية ببكتريا Bt تحقق المواصفات القياسية لاوامر المنتج والتي وضعت لقليل من الاصناف النباتية. التقييم الخاص بصحة وعنفوان النبات ، خصائص النمو والانتاجية المحصولية والجودة والحساسية للأمراض والحشرات اظهر ان النباتات المحمية ببكتريا باسيليس متكافئة مورفولوجيا وزراعيًا للنباتات الام.

لقد تم اجراء تحليل جزئي تفصيلي لكل محصول محمي ببكتريا Bt لتوصيف والتأكد من ان المادة الوراثية المطلوبة تم ادخالها. اكد التحليل اللاحق ان الكراي والعلامة البروتينات ادخلت فعلا كما تنبأ من التوصيف الجزئي. الكراي بروتينات ذات تاريخ طويل عن امان الاستخدام في منتجات الباسيليس الميكروبية. لتأكيد امان الكراي بروتينات في المحاصيل. المنتمية ببكتريا Bt اجريت دراسات توكسيكولوجية علي الثدييات كما وصف قبلا. البروتين العلامة المختارة للنومايسين فوسفوترانسفيريز II (NPT II) استخدم في القطن الباسيلي والبطاطس لتحقيق انتخاب الخلايا النادرة المطلوبة والتي تكتسب جين البكتريا Bt. جين npt II والبروتين المشفر ذات تاريخ في امان الاستخدام بناء علي وجود جين npt II والبروتين المشفر في المعدة وميكروبات التربة. امان بروتين NPT II تم

تقييمة فسي دراسات السمية الحادة في الفئران عن طريق الفم ودراسات سلوك الهضم بالمقارنة مع الدراسات التي وصفت اعلاه مع الكراي بروتينات (Fuchs وآخرون ١٩٩٣ ، ب). لم تلاحظ اية تأثيرات معاكسة في دراسات السمية الحادة عن طريق الفم حتي ٥ مليون مرة اعلي في المستوي عن الاستهلاك المتوقع. البروتينات العلامه تنهار بسرعة حيث وجدت نصف فترة حياه اقل من ٣٠ ثانية في دراسات محاكاة سلوك الهضم.

جدول (٨-١١): مقارنة الخصائص البيوكيميائية للكراي بروتينات والعلاقة المختارة والبروتينات المعروف عنها احداث الحساسية Allergenic proteins

| الخصائص | المواد المعدثة للحساسية Allergens | بروتينات الكراي او العلاقة |
|-------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------|
| البروتين وثيق الصلة في الغذاء | نعم | لا |
| الثبات مع الهضم | نعم | لا |
| الثبات مع عمليات التجهيز | نعم | لا |

Source: Fuchs et al. (1993b); Sanders et al. (1998); Lavrik et al. (1995); Berberich et al. (1996).

بروتينات المعلم المختارة NPT II والكراي بروتينات لم تظهر ايه تأثيرات حساسة كبيرة البروتينات المعدثة للحساسية الشائعة وجدت وثيقة الصلة بالغذاء وثابتة لظروف التحلل البروتيني والحامضي لنظام الهضم كما انها ثابتة لظروف تجهيز الغذاء كما تكون جليكوسيلية. لم تنقسم أي من الاقسام الثلاثة للكراي بروتينات ١ ، ٢ ، ٣ وكذلك البروتين العلامة المختارة NPT II أي من هذه الخصائص (جدول ٨-١١). أي من هذه المعايير البيوكيميائية وحدها لا تمكن من التنبؤ بالقدرة علي احداث حساسية البروتينات ولكن دمج هذه الصفات تقدم اساس قوي لاستنتاج ان هذه البروتينات ليست لها اية تأثيرات لاحداث الحساسية. نقص التقارير عن الحساسية للمستحضرات الميكروبية التجارية تعضد نقص التأثيرات الخاصة بالحساسية للكراي بروتينات. لقد تم تقييم المغذيات الهامة والمواد المضادة للتغذية ANTINUTRIENTS بالتفصيل لكل المحاصيل ومقارنتها بالخطوط الابوية وبما هو منشور في الدراسات المرجعية عن الاصناف النباتية. قائمة كل مكونات التحليل لهذه المحاصيل موضحة في جدول (٨-١٢). النباتات التي اشتقت من هذه التحليلات اوضحت ان المحاصيل المحمية ببكتريا Bt (نرة - قطن - بطاطس) متوافقة لحد كبير في التركيب للخطوط الابوية (Sanders وآخرون ١٩٩٨ ، Lavrik وآخرون ١٩٩٥). خلاصة القول ان البيانات التي تحصل عن امان الكراي والعلامة بروتينات

والتركيب تؤكد علي امان الغذاء والاعلاف المشتقة من المحاصيل البكتيرية Bt والتي حصلت علي الموافقة الكاملة للتسويق.

جدول (٨-١٢): القائمة الموصي بها للمواد المغذية الفاتحة ومضادات التغذية لوضع التكافؤ الكبير في المحاصيل الموضحة.

| المكون | ثرة | قطن | بطاطس |
|-------------------------------|-----|-----|-------|
| البروتين | ✓ | ✓ | ✓ |
| الدهن | ✓ | ✓ | |
| النشا (كربوهيدرات) * | ✓ | | |
| الكثافة النوعية (مواد صلبة) | | | ✓ |
| الالياف الخام | | | ✓ |
| الياف المادة المنظفة الحامضية | ✓ | ✓ | ✓ |
| الياف المادة المنفة المتعارضة | ✓ | ✓ | |
| الاحماض الامينية الفردية | ✓ | | |
| الاحماض الدهنية الاساسية | ✓ | ✓ | |
| الجو سيبول | | ✓ | |
| المعادن | ✓ | ✓ | ✓ |
| الفيتامينات | ✓ | ✓ | ✓ |
| الجليكو الكاليوز | | ✓ | ✓ |
| احماض دهنية جليكوبروبيونوز | | ✓ | |
| الميكوتوكسينات | ✓ | ✓ | |

*في التقاوي والحبوب والدرنات او الثمار

التاثيرات البيئية Environmental implications

التاثيرات البيئية للكراي بروتينات Environmental impact

لقد خلصت وكالة حماية البيئة الامريكية USEPA الي مخاطر السمية وعدوي بسبب تاثيرات الدلتا-اندوتوكسينات علي الطيور غير المستهدفة واسماك المياه العذبة واللافقاريات والمحار والحيوانات الحرة ومفصليات الارجل من مفترسات/طفيليات ونحل العسل والقراء والحيوانات النديية تتراوح من اقل ما يمكن minimal وحتى عدم الوجود عند معدلات الاستخدام الموصي بها والموضحة علي البطاقات الاستدلالية لتسجيل بكتريا الباسيلليس ثورينجنسيز من المواد الفعالة (EPA 1998 - 1). هذا يقدم دليل قوي ان الكراي بروتينات في النباتات المهندسة بالباسيلليس Bt والتي ووفق علي تسويقها تملك

مخاطر قليلة علي الكائنات غير المستهدفة. مستوى التعرض للكراي بروتين في نباتات البكتريا Bt قليلة لحد كبير عما هو الحال مع التعرض من استخدام المنتجات الميكروبية الباسيلية Bt مع المعدلات الموجودة علي البطاقات الارشادية. بسبب ان الكراي بروتينات تنهار بسرعة كما انها تنتج بصفة مستمرة في النباتات الباسيلية فان دوام التعرض في البيئة سيكون طويلا مع النباتات البكتيرية بالمقارنة بمنتجات Bt الميكروبية.

الكراي بروتينات المعبر عنها والتي حظيت بالموافقة الكاملة في منتجات Bt في امريكا اظهرت قليل او عدم تاثير علي الطيور والاسماك واللافقاريات المائية ومدى واسع من الحشرات النافعة (جدول ٨-١٣). اجريت دراسات تم فيها معاملة الكراي بروتين المنقي الذي ينتج في النظم الميكروبية لتوصيف الصفات التوكسيكولوجية لهذه البروتينات علي الكائنات غير المستهدفة. كذلك تمت تغذية الحيوانات بطريقة قريب الشبه ويحاكي التعرض الطبيعي للبروتين علي الحبوب اللقاح وانسجة الورقة من مختلف المنتجات النباتية المحمية بباسيليس Bt. بوجه عام اتضح عدم حدوث موت او اية تاثيرات سلوكية علي الحيوانات غير المستهدفة التي تغت علي الكراي بروتين بكميات تزيد عن التعرض الطبيعي عشرة امثال علي الاقل وعادة اكثر من ١٠٠ مثل في جميع الحالات لم تسجل حالة واحدة ظهر فيها تاثيرات معاكسة عند مستويات الكراي بروتينات التي تقارب ما يحدث تحت الظروف العادية. بوجه عام تم توصيف الكراي بروتينات علي انها غير سامة علي الكائنات غير المستهدفة (EPA ١٩٩٦ ج-).

عدم احداث فاعلية او نشاط الكراي بروتينات ضد الكائنات غير المستهدفة لا يثير الدهشة من منطلق التخصص الشديد للهدف. هذا لدرجة ان مفترسات ابو العيد النافعة لا تتاثر بالبروتينات cry3Aa بالرغم من فاعليتها الشديدة علي خنفساء كلورادو البطاطس (Dogan واخرون ١٩٩٦). بسبب ان العديد من الكراي بروتينات لا تتاثر ضد افات حشرات حرشفية الاجنحة (ابي دفيقات والفراشات) الا انه قد يكون لها فاعلية ضد حشرات بخلاف حرشفية الاجنحة ، هذا ولو ان النباتات البكتيرية Bt عادة ما يكون لها خطر قليلة للغاية علي هذه الانواع غير المستهدفة لاسباب عديدة. السبب الاول انه علي غرار الكائنات غير المستهدفة فان حرشفيات الاجنحة النافعة قد لا تكون حساسة للكراي بروتينات. اذا كانت الكائنات غير المستهدفة حساسة يكون ذلك قاصرا علي الاطوار الاولى القليلة فقط. مثال ذلك ان الحشرات الكاملة حتي المستهدفة تظهر نقص كبير في الحساسية. لقد وجد Halcomb واخرون (١٩٩٦) ان العمر الخامس من دودة براعم

الدخان ودودة اللوز قليلة الحساسية بشكل كبير للكراي Cry1Ac عن الاطوار المبكرة لهذه الحشرات. السبب الثاني يتمثل في ان درجة التعرض للكراي بروتين في النباتات المحمية ببكتريا Bt محدودة للغاية الا اذا كانت الحشرات تتغذى مباشرة علي النباتات او اجزاء منه. الديدان التي تتغذي علي النباتات البكتيرية سوف تتعرض ولكنها ينظر اليها كافات. ابي دقيقات البالغة والفرشات قد تزور ازهار المحاصيل البكتيرية للتغذية علي الرحيق ولكن القليل او لا يوجد كراي بروتين في الرحيق وفي أي الاحوال فان طور الحشرة الكاملة في حرشية الاجنحة ليست حساسة للكراي بروتين.

جدول (٨-١٣): سمية الكراي بروتينات للكائنات غير المستهدفة:

| الكائنات غير المستهدفة | نتائج الاختبارات | | Cry1Ab (نرة) |
|------------------------|---|--------------------|------------------------|
| | Cry3A (بطاطس) | Cry1Ac (قطن - نرة) | |
| خنافس ابي العيد | غير سامة عمليا | غير سامة عمليا | غير سامة NOEC>20 |
| الكولمبول | NOEC>200 ppm | NOEC>200 ppm | NOEC>200 ppm |
| نحل العسل | غير سامة علي اليرقات | غير سامة عمليا | غير سامة NOEC>200 ppm |
| دودة الارض | - | - | غير سامة NOEC>20 ppm |
| الدبابير الطفيلية | غير سامة عمليا | غير سامة عمليا | غير سامة NOEC>20 ppm |
| البق الاخضر | غير سامة | غير سامة | غير سامة NOEC>16.7 ppm |
| العصفور الابيض | غير سامة ج ق = اكثر من ٥٠٠٠٠ جزء في المليون | غير سامة عمليا | NOEC>100000 ppm |
| دافنيا | لا تطبق عليها NA | لا تطبق عليها NA | غير سامة NOEC>100 ppm |
| سمك | لا تطبق عليها NA | - | عديمة التأثير |

NA= not applicable

NOEC = التركيز عديم التأثير الملحوظ

التغذية غير المتعمدة ليرقات الحشرات علي حبوب اللقاح المنتشرة بالرياح قد تحقق فرصبة كبيرة للتعرض للكراي بروتين للحشرات حرشية الاجنحة غير المستهدفة (ابي دقيق). هذا الوضع يخلق خطر او ضرر محسوس في حالة ما اذا كانت كل الظروف الفراغية والمؤقتة والحيوية الاتية متوفرة:

- ١- يجب ان تكون حبوب اللقاح محتوية علي بعض من الكراي بروتين
 - ٢- يجب ان تنتشر كميات كافية من الكراي في حبوب اللقاح علي النباتات وتظل عليها والتي تتغذي عليها حشرات حرشفية الاجنحة غير المستهدفة
 - ٣- يجب ان تكون حشرات حرشفية الاجنحة حساسة للكراي بروتين
 - ٤- يجب ان يحدث تساقط لحبوب اللقاح عندما تكون اليرقات في الاعداد الاولى الحساسة للكراي بروتينات
 - ٥- يجب ان تقوم اليرقات بتناول وهضم حبوب الكراي مع حبوب اللقاح بكميات كافية لتغير التطور الطبيعي لليرقات.
- هذه الظروف قد توجد بشكل محدود كلي وجزئي مع جزء من مجموع الحشرات. كذلك لا توجد ادلة تشير الي ان هذه الظروف تحدث بتكرارية تؤدي لحدوث أي معنوية علي مجموع ابي دقيق (Sears وآخرون ١٩٩٩). لقد اجريت دراسات استهدفت القاء الضوء عن كمية حبوب اللقاح من النرة المهندس وراثيا بكتريا Bt والتي تتساقط وكذلك مسافة وقوعها وتأثير ذلك علي درجة تعرض ابي دقيق. لقد خلص الباحثون في الدراسات العملية ان نمو وتطور ابي دقيق لم يتأثر عندما تغذت اليرقات واستهدفت نسيج ورقة خشيشة اللبن المعاملة بمعدل ١٥٠ حبة لقاح/سم² من حبوب لقاح النرة البكتيري. لقد خلص الباحث Dively وآخرون (٢٠٠٠) ان ٨% فقط من الاوراق داخل وعلى حواف حقول النرة و ٢% فقط من الاوراق علي بعد ١-٥ متر من الحقل تحقق رواسب من حبوب اللقاح اكبر من ١٥٠ حبة/سم². مرة اخري تأكد الباحث من العلاقة بين تركيز حبوب اللقاح ودرجة التعرض لاحداث اية اضرار علي ابي دقيقات وهذا اساس يؤخذ في تجارب تقويم المخاطر.

التاثيرات البيئية للنباتات المهندس وراثيا بكتريا الباسيلليس Bt

بسبب ان الكراي بروتينات ذات تاثير قليل او عديمة التأثير علي الفقاريات واللافقاريات بما فيها مدي واسع من الحشرات النافعة والمجموع غير المستهدفة فانه يتوقع زيادة تعدادها بسبب ادخال المحاصيل الباسيلية والتي تقلل من استخدام المبيدات الحشرية واسعة التأثيرات. زيادة المجموع هذه يؤدي الي زيادة شاملة في التنوع الحيوي داخل النظم الزراعية وكذلك تقلل من احداث خلل في عدد العمليات الايكولوجية جين المؤثرة. كما نوقش قبلا فان مجاميع الحشرات غير المستهدفة يتوقع ان تزيد مع خفض استخدام المبيدات الحشرية واسعة التأثير. لقد تأكد هذا الوضع مع نباتات القطن والبطاطس المهندس وراثيا.

زيادة المجموع في الحشرات النافعة يسمح للمكافحة الحيوية ان تلعب دورا كبيرا ومؤثرا في تنظيم والسيطرة علي انواع الافات الاولى والثانوية. التأثير علي العمليات الحيوية التي تحدث في التربة تتأثر وتقل بدرجة كبيرة كذلك مع زراعة النباتات الباسيلية بدلا من الاعتماد علي المبيدات مما لا يؤثر علي اللافقاريات التي تسكن التربة قبل الكولمبول وديدان الارض. لقد لوحظ كذلك زيادة الطيور في الحقول المزروعة بالمحاصيل المهندسة وراثيا. ليكن في الحسبان ان الكراي بروتينات تدخل التربة من خلال دفن النباتات في التربة وقد ثبت ان هذه الكراي بروتينات تنهار بسرعة في التربة بمعدلات مقارنة لمعدل اختصار الكراي بروتينات في منتجات بكتريا Bt (Palm) وآخرون ١٩٩٣ ، ١٩٩٤ ، ١٩٩٦....). بناء علي المعلومات التي ذكرت قبلا فان التخصص الشديد للكراي بروتينات والانهار السريع في الارض تقدم دليل قوي علي ان الكراي بروتينات في بقايا النباتات من المحاصيل المهندسة ببكتريا Bt لا تسبب اية مخاطر علي البيئة.

النشر العريض في زراعة النباتات البكتيرية Bt يثير بعض الاسئلة عن امكانية انسياب او نشر جينات الكراي لانواع النباتات البرية وتطور مقاومة الافات لفعل الكراي بروتينات. هذا التساؤل يؤخذ في الاعتبار قبل هندسة البطاطس والذرة والقطن البكتيري في كل من امريكا وكندا والمكسيك والارجنتين وغيرها من البلدان والتي تم قبول هذه النباتات فيها او هي في سبيل القبول. بالنظر الي انسياب الجين والنواحي التقسيمية والوراثية وطريقة التكاثر والقدرة العنبرية في محاصيل القطن والذرة والبطاطس فانه ثم استيضاح ووضع النقاط التالية: ١- عدم مقدرة جينات الكراي المزروعة في الاصناف التجارية لهذه المحاصيل علي العبور الي الانواع البرية ، ٢- اذا حدث انسياب للجين فان التأثير يجب ان يقيم. لم تثبت باي دليل حدوث عبور في الذرة في امريكا بسبب عدم وجود اقارب للذرة في امريكا بينما تم تقييم حدوث هذا العبور في المكسيك بسبب وجود عوائل اخري تتوافق مع الذرة. بالنسبة للبطاطس فان الصنف التجاري المهندس وراثيا واسع الانتشار وهو Russet Burbank وهو ذكري عقيم ومن ثم يكون من المستحيل نشر وانسياب الجين. بالاضافة الي ذلك فان البطاطس ليست متوافقة جنسيا مع اي نوع نباتي قريب في امريكا الشمالية لذلك لا يكون هناك اي احتمال لحدوث العبور. بالنسبة للقطن هناك نوعان بريان فقط في امريكا وهما *G. thurberi* في اريزونا و *G. tomentosum* في هاواي وهما يمكننا من احتمالات حدوث العبور مع اصناف القطن التجارية. القطن المزروع من النوع allotetraploid بينما الصنف *G. thurberi* من النوع diploid وهذا يعني انهما غير متوافقان ومن ثم لا يمكن ان ينجبا نسل خصب. كذلك فان الصنف *G. t.* غير متوافق

مورفولوجيا مع الاصناف التجارية لذلك لا يوجد خوف من احتمال حدوث التهجين العبوري في القطن في أمريكا. مع هذا فانه مع محاولات الحصول علي نباتات مهندسة وراثيا يجب اخذ عملية التهجين العبوري في الاعتبار.

مجاميع الافات التي تتعرض للنباتات المهندسة وراثيا عندها مقدرة لتكوين سلالات مقاومة للكراي بروتينات ولو ان المقاومة ليست متماثلة مع كل المحاصيل. تجدر الاشارة الي انه من بين اهم اسباب محاولات وادخال النباتات المهندسة وراثيا ببكتريا BT ما حدث من خفض في كفاءة المبيدات الحشرية من مجموعة البيرثريونز المخلقة بسبب ظهور مقاومة الحشرات لفعالها. لذلك ثم وضع خطط طويلة المدى لمنع تطور المقاومة في النباتات البكتيرية.

Reference

- Amer, C., Berry, A. R. E., and Kogan, M. (1999). Effects of phytophagous Heteropteran predators of feeding on transgenic Bt potato plants. Submitted for publication.
- Astwood, J-D., Leach, J. N., and Fuchs, R. L. (1996). Stability of food allergens to digestion in vitro. *Natur Bio/Technol.* 14, 1269-1273.
- Barbera, P. W. (1995). Toxicity/Pathogenicity Testing of *Bacillus thuringiensis* Strain EG 7826 Following Acute Oral Challenge in Rats, IITRI Project No. L08574, IIT Research Institute, Chicago, IL.
- Baum, J. A., Johnson, T. B., and Carlton, B. C. (1999). *Bacillus thuringiensis* natural and recombinant bioinsecticide products, *Tn Methods in Biotechnology. Vol 5. Biopesticides: Use and Delivery* (F. R. Hall and J. J. Mean, Eds.), pp. 189-209. Humana Press, Inc., Totowa, NJ.
- Berberich, S. A., Ream, J. E., Jackson, T. L., Wood, R., Stipanovk, R., Harvey, P., Patzcr, S., and Fuchs, R- L. (1996). Safety assessment of insect-protected cotton: The composition of the cottonseed is equivalent to conventional cottonseed, *J. Agric. Food Chem.* 41, 365-371.
- Carter, J. N., Baker, M. N., and Denton, S. M. (1993). Acute Oral Toxicity and Infectivity/Pathogenicity to Rats of EG7673. HRC Study Report No- ECO 1/930923. Huntingdon Research Centre Ltd., Huntingdon, Cambridgeshire, England.
- Carter, J. N., and Liggett, M. P. (1994). Acute Oral Toxicity and Infectivity/Pathogenicity to Rats of EG 7841, HRC Study Report No. ECO 6/942538. Huntingdon Research Centre Ltd., Huntingdon, Cambridgeshire, England.
- Crickmore, N., Ziegler, D. R., Feitelson, J., Schnepf, F., Van Rie, J., Lereclue, R., Baum, J., and Dean, D. II, (1998). Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 807-813.
- Culpepper, A. S. and York, A. C. (1998). Weed management in glyphosate-tolerant cotton. *J. Cotton Sci.* 4. 174-185.
- David, R. M. (1998). Acute Oral Toxicity/Pathogenicity Study in the Rat. Unpublished study prepared for Ecogen, Inc. EPA MRTD No. 409511-02.

- Dively, G., Foster, J. E., Dark, T. L., and Jones, G. D. (2000). Deposition of Corn Pollen on Miikwerd Plants in Maryland and Nebraska. Presented at the Monarch Butterfly Research Symposium, Chicago, IL, Nov. 2, 1999, Agricultural Biotechnology Stewardship Working Group.
- Dogan, E. B., Berry, R. E., Reed, G. L., and Rossignol, P. A. (1996). Biological parameters of convergent lady beetle (Coleoptera: Coccinellidae) feeding on aphids (Homoptera: Aphididae) on transgenic potato. *J. Econ. Entomol.* 89, 1105-1108.
- English, L., and Statin, S. L. (1992). Mode of action of delta-endo-toxin from *Bacillus thuringiensis*: A comparison with other bacterial toxins. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 22, 1-7.
- EPA (1986), EPA Fact Sheet for *Bacillus thuringiensis* Subspecies *kurstaki*, *israelensis*, and *aizawai*, September 1986 (Abbott).
- EPA (1988). EPA Guidance for the Re-registration of Pesticide Products Containing *Bacillus thuringiensis* as the Active Ingredient. Re registration Standard 540; RS-89-023,
- EPA (1991). EPA Fact Sheet for Delta Endotoxin of *Bacillus thuringiensis* variety San Diego Encapsulated in Killed *Ps fluorescens*, June 27, 1991 (Mycogen Corporation).
- EPA (1995a). EPA Fact Sheet for *Bacillus thuringiensis* Subspecies *kurstaki* CryI A (b) Delta Endotoxin and Its Controlling Sequences in Corn, March 21, 1995 (Ciba Seeds).
- EPA (1995b). EPA Fact Sheet for *Bacillus thuringiensis* Subspecies *tenebrionis* Cry3A Delta Endotoxin and Its Controlling Sequence in Potato, May 5, 1995 (Monsanto),
- Munkvold, G. P., Hellmich, R. L., and Rice, L. R. (1999). Comparison of fumonisin concentrations in kernels of transgenic bt maize hybrids and nontransgenic hybrid. *Plant Dis.* 83, 130-138,
- Norred, W. P. (1993). Fumonisins-mycotoxins produced. *J. Toxicol. Environ. Health* 38, 309-328.
- Noteborn, H. P. J. M., Rienmann-Plouiri, M. E., van den Berg, J. H. J., Alink, G. M., Zolla, L., and Kuiper, H. A. (1993). Food safety of transgenic tomatoes expressing the insecticidal crystal protein CryIAb from *Bacillus thuringiensis* and the marker enzyme APH(3')IT. *Med. Fac. Landhouww. Univ. Gent* 58/4b,
- Noteborn, H. P. J. M., Rienmann-Ploum, M. E., van den Berg, J. H. J., Alink, G. M., Zolla, L., and Kuiper, H. A. (1994). Consuming transgenic food crops: The toxicological and safety aspects of tomato expressing CryIAb and NPTII. In ECB6: Proceedings of the 6th European Congress on Biotechnology. Elsevier, Amsterdam.
- Palm, C. J., Seidler, R. J., Donegan, K. K., and Harris, D. (1993). Transgenic plant pesticides: Fate and persistence in soil. *Plant Physiol. Suppl* 102, 166.
- Palm, C. J., Donegan, K. K., Harris, D., and Seidler, R. J. (1994). Quantitation in soil of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* delta-endotoxin from transgenic plants. *Mol. Ecol.* 3, 145-151.
- Palm, C. J., Schaller, D. L., Donegan, K. K., and Seidler, R. J. (1996). Persistence in soil of transgenic plant produced *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* delta-endotoxin. *Can. J. Microbiol.* 42, 1258-1262.
- Perlak, F. J., Deaton, R. W., Armstrong, T. A., Fuchs, R. L., Sims, S. R., Greenplate, J. T., and Fischhoff, D. A. (1990). Insect resistant cotton plants. *Bio/Technology* 8, 939-943.
- Perlak, F. J., Fuchs, R. L., Dean, D. A., McPherson, S. L., and Fischhoff, D. A. (1991). Modification of the coding sequence enhances plant expression of insect cotton protein genes. *PNAS* 88, 3324-3328.
- Perlak, F. J., Stone, T. B., Muskopf, Y. M., Petersen, L. J., Parker, G. B., McPherson, S. A., Wyman, J., Love, S., Reed, G., Biever, D., and Fischhoff, D. A. (1993). Genetically

- improved potatoes: protection from damage by Colorado potato beetles. *Plant Mol. Biol.* 22, 313-321.
- Pleasant, J. M., Hellmich, R. L., and Lewis, L. C. (1999). Pollen Deposition on Milkweed Leaves under Natural Conditions and Assessment of Risk to Monarch Butterfly Larvae from Bt Pollen. Presented at the Monarch Butterfly Research Symposium, Chicago, IL, Nov. 2, 1999. Agricultural Biotechnology Stewardship Working Group.
- Ream, J. E., Berberich, S. A., Sims, S. R., Rogan, G. J., and Fuchs, R. L. (1992). In planta distribution and environmental fate of insect resistant proteins. *Plant Physiol. Suppl.* 99, 80.
- Reed, G. L., Puls, K., Jensen, A. S., Feldman, J., and Berry, R. E. (1993). The effect of Colorado potato beetle control measures on non-target arthropods. In *Proceedings of the 1993 Washington State Potato Conference and Trade Fair*, pp. 125-140.
- Rice, M. (1998). Grower Surveys. Iowa State University, Sanders, P. R., Lee, T. C., Groth, M. E., Astwood, J. D., and Fuchs, R. L. (1998), Safety assessment of the insect-protected corn. 1 Biotechnology and Safety Assessment (J. A. Thomas, Ed.), 2nd ed pp. 241 -256, Taylor & Francis, London.
- Saxena, D., Flores, S., and Stotzky, G. (1999). Transgenic plant Insecticidal toxin in root exudates from Bt corn. *Nature* 402, 48.
- Schnepf, H. E., and Whiteley, H. R. (1981). Cloning and expression the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 2893-2897.
- Sears, M. K., Stanley-Horn, D. E., and Mattila, H. R. (1999). Preliminary Report Investigating the Ecological Impact of Bt Corn Pollen on Populations of Non-target Lepidoptera Including the Monarch Butterfly in Ontario. Report, submitted to the Canadian Food Inspection Agency, Guelph, Ontario.
- Sears, M. K., and Stanley-Horn, D. (2000), Impact of Bt corn pollen on monarch butterfly populations. In *Proceedings from the 6th International Symposium on The Safety of Genetically Modified Organisms* (C. Fairbairn, G. Scles, and A. McHughen, Eds.). Univ. Extension Press, Univ. of Saskatchewan, SK, Canada.
- Sims, S. R., and Holden, I. R. (1996). Insect bioassay for determining soil degradation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* [CryIA(b)] protein in corn tissues. *Environ. Entomol.* 25, 659-664.
- Sims, S. R., and Martin, J. W. (1997), Effect of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins CryIA(b), CryIA(c), CytIIA, CryIIIA on *Folsomia candida* and *Xenylla gnsea* (Insecta: Collembola). *Pedobiologia* 41, 412-416.
- Sjoberg, R. D., McClintock, J. T., and Engler, R. (1992). Lexicological considerations for protein components of biological pesticide products. *J. Econ. Entomol.* 80, 717-723.
- Smith, R. H. (1997). An extension entomologist's 1996 observations of Bollgard Bt technology. In *1997 Proceedings Beltwide Cotton Conferences*.
- Smith, R. H. (1999). Alabama entomologist believes genetic engineering and eradication will usher in a new era of cotton pests. *Cotton Grower Plus* March 1999.
- Spencer, T. M., Orozco, E. M., and Doyle, R. M. (1996), Petition for Determination of Non-regulated Status: Insect Protected Corn (*Zea mays* L.) with cryIAc Gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. DEKALB Genetics Corporation, October 14, 1986.
- Stephens, S. G. (1964), Native Hawaiian Cotton [*Gossypium tomentosum* Nutt.]. *Pau. Sci.* 18, 385-398.
- Taylor, S. L., and Lehrer, S. B. (1996). Principles and characteristics of food allergens. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 36(S), S91-S118.
- Thompson, M. A., Schnepf, H. E., and Feitelson, J. S. (1995), Structure, function and engineering of *Bacillus thuringiensis* toxins. *Genet. Eng.* 17, 99-117.
- USDA (1975), Cooperative Economic Insect Report. APHIS 25, 32,

- USDA Technical Assessment Systems (1993). Exposure 1, Chronic Dietary Exposure Analysis Program (1987-88 or 1977-78 USDA Surveys). Technical Assessment Systems, Inc., Washington, DC.
- USDA (1998). Pest Management Practices: 1997 Summary. National Agricultural Statistics Service. SPCRI (98).
- Vaeck, M., Reybnaerts, A., Hofte, J., Jansens, S., DeBeuckeleer, M., Dean, C., Zabeau, M., Van Montagu, M., and Leemans, J. (1987). Transgenic plants protected from insect attack. *Nature* 328, 33-37.
- Weinzieri, R., Pierce, C., and Steffey, K. (1997). Preliminary results of 1997 summer survey for Br-resistant European corn borers. *Pest Manage. Crop Dev. BuSl.* 22, 183-184.
- WHO (World Health Organization) (1998). GEMS/FOOD REGIONAL DIETS. Food Safety Unit, Programme of Food Safety and Food Aid. WHO/FSF/FOS/98,3 WHO.
- Williams, M. R. (1997). Cotton insect losses 1979-1996. In 1997 Proceedings Beltwide Cotton Conferences.
- Williams, M. R. (1999). Cotton Crop Losses. Retrieved June 1999 from the World Wide Web: <http://www.msstate.edu/Entomology/CTNLOSS/1998loss.html>.
- Xia, J. Y., Cut, J. J., Ma, L. H., Dong, S. X., and Cui, X. F. (1999). The role of transgenic Bt cotton in integrated insect pest management. *Ada Gossypsi Sim.* 11, 57-64.
- EPA (1995c). EPA Fact Sheet for *Bacillus thuringiensis* Subspecies *kurstaki* Cry1Ac Delta Endotoxin and Its Controlling Sequences as Expressed in Cotton, October 1995 (Monsanto).
- EPA (1996a). EPA Fact Sheet for *Bacillus thuringiensis* Subspecies *kurstaki* Strain EG 7841, September 1996 (Ecogen).
- EPA (1996h). EPA Fact Sheet for *Bacillus thuringiensis* Subspecies *kurstaki* Cry1Afbj Delta Endotoxin and Its Controlling Sequences as Expressed in Corn. December 20, 1996 (Monsanto).
- EPA (1997). EPA Fact Sheet For *Bacillus thuringiensis* Subspecies *kurstaki* Cry1 A (c) Delta Endotoxin and the Genetic Material Necessary for Its Production in Corn, March 1997 (DeKath Genetics).
- EPA (1998a). EPA registration eligibility Decision (RED) *Bacillus thuringiensis*. EPA 738-R-98-004, March 1998.
- EPA (1998b). (RED Facts) *Bacillus thuringiensis*, EPA-738-F-98-001, Falck-Zepeda, J. B., Trailer, G., and Nelson, R. G. (1999). Rent Creation and Distribution from Biotechnology Innovations: 'The Case' of Bt Cotton and Herbicide-Tolerant Soybeans in 1997. ISAAA Briefs No. 14, ISAAA, Ithaca, NY.
- Federal Register. *Bacillus thuringiensis* Cry1A(b) delta, endotoxin and the genetic material necessary for its production in all plants; exemption from requirement of a tolerance; Final Rule; 61 FR 40340. August 2, 1996.
- Feldman, J., Reed, G. L., Wyman, J. A., Stewart, J., and Stone, T. B. (1992). Genetically Modified Colorado Potato Beetle Resistant Potato Plants, Foliar-Applied Microbial Bt and Conventional Insecticides: Comparative Impacts on Non-target Arthropods, Appendix I, NewLeaf Public Interest Document, EPA. Fischhoff, D. A., Bowditch, K. S., Perlak, F. J., Man-one, P. G., McCormick, S. M., Nidermeyer, J. G., Dean, D. A., Kusano-Kretzmer, K., Mayer, E. J., Rochester, D. E., Rogers, S. G., and Fraley, R. T. (1987). Insect tolerant transgenic tomato plants. *Bio/Technology* 5, 807-813.
- Fisher, R., and Rusner, L. (1959). Toxicology of the microbial insecticide, Thuricide, *Agric. Food Chem.* 7, 686-688.
- Fryxell, P. A. (1979). The Natural History of the Cotton Tribe (Malvaceae, Tribe Gossypieae). Texas A&M Univ. Press, College Station, TX.

الفصل الثالث

النباتات المهندسة وراثيا بشكل عام في كندا وأمريكا

أولاً: تشريعات الأمان الحيوي:

مقدمة: لقد تقدمت طرق ووسائل الهندسة الوراثية للدرجة التي مكنت من توفير المنتجات الناتجة من دمج وهندسة الكائنات الحية للمستهلكين. إذا قصرنا الكلام بشيء من التخصص على النباتات يمكن القول أن كل المحاصيل الزراعية الهامة تقريباً قد تم هندستها في اتجاه صنف لتحسين واحد أو أكثر مقاومة للآفات (Gasser and Fraley، ١٩٨٩). المحاصيل التي تنتج نوعية أفضل من الغذاء أكثر مقاومة للآفات والإجهاد والضغط البيئي وتهندس كي تتحمل الأضرار السيئة التي تحدثها مبيدات الحشائش. هذه المنتجات ذات أهمية واقعية بشكل كبير في تحقيق الفوائد لمصنعي الغذاء والمستهلكين والزراعة بوجه عام. هذه المنتجات ستكون أكثر تكلفة لإنتاجها وتصنيعها كذلك ستكون ذات قيمة غذائية عالية وسوف تحقق مرونة أكثر للفلاحين في العمليات الزراعية المؤثرة. نظرة مستقبلية عن هذا الاقتراب توضح أن النباتات قد تستخدم لإنتاج كميات كبيرة من الببتيدات المفيدة العلاجية وكذلك الدواء الكيميائي النادر مثل التاكسول بأسعار زهيدة. صناعة التكنولوجيا الحيوية في النباتات وصلت الآن إلى نقطة أصبحت عندها الاختبارات الحقلية للنباتات المحورة وراثياً (GMPs) محل تقدير على أنها خطوة عقلانية ودرجة في تقييم الأمان والاقتدار التجارى والتأثيرات البيئية لكل منتج. يمكن القول أنه قد أجريت مئات من الاختبارات الحقلية على مستوى العالم دون أية حوادث عارضة وتم إعداد تقارير علمية عنها (Ginzburg، ١٩٩١، المركز القومي للبحوث، ١٩٨٩، Halvorion وآخرون، ١٩٨٥) وغيرها. الوصول لهذه المرحلة في العملية التجارية يتطلب العمل مع الهيئات الحكومية التي تملك السلطة للموافقة على إجراء الاختبارات الحقلية للنباتات المحورة وراثياً. إن طلب الحصول على موافقة السلطات المعنية لنشر النباتات المحورة على المستوى الحقلى يتطلب تقديم كافة البيانات والمعلومات عن الكائن وطريقة التحويل والجين وأصله والمنتجات المعبر عنها ونواتج التعبير وتأثيراتها على البيئة. هذه البيانات تنأتى من الدراسات تحت الظروف المتحكم فيها مثل الصوب الزجاجية وحجر النمو.

النواحي التشريعية Regulatory aspects

استعراض ونظرة عامة

لقد قام مربى النباتات بالتحوير الوراثي للنباتات على امتداد قرون لتحسين الصفات الزراعية للمحاصيل ونباتات الزينة. في كندا وأوروبا توجد طلبات للموافقة لكل الأصناف النباتية الجديدة بينما في أمريكا لا توجد هذه المتطلبات. إن الاهتمام الزائد باستخدامات وكفاءة وإمكانيات اقترابات الهندسة الوراثية في تحسين النباتات تطلبت اشتراك العديد من المكاتب والهيئات الحكومية في عملية ودور التشريعات. في كندا وأمريكا وأوروبا واليابان تكون بعض الهيئات والوكالات التي تنظم الصناعات الزراعية والغذائية تحت مظلة القوانين القومية مسؤولة عن نشر النباتات GMPs في البيئة. مع مساعدة الخبراء الأكاديميين ورجالات الصناعة ومجموعة الخبراء العالميين وكذلك منظمة تطوير التعاون الاقتصادي (OECD) والدلائل تم تطويرها لتنظيم تسجيل والتعامل مع GMPs.

التشريعات في كندا

الحكومة الكندية تعضد بقوة تطوير التكنولوجيا الحيوية في كندا كوسائل ومداخل لتقوية التنافس الاقتصادي. التشريعات الكندية والنظرة الشاملة للتعامل مع النباتات المهندسة وراثيا GMPs تقسم بين ثلاثة وكالات. وزارة الزراعة الكندية التي تنظم المنتجات الزراعية الناتجة من التكنولوجيا الحيوية بما فيها الأعلاف الحيوانية والأسمدة والمبيدات والتقاوى والمواد البيولوجية البيطرية. تقدم هذه التشريعات نظام للتفتيش للتأكد من الجودة والأمان ونقاوة الأغذية. تتطلب الاختبارات الحقلية للنباتات المهندسة وراثيا GMPs في كندا موافقة وتصريح من وزارة الزراعة الكندية وهي المسؤولة عن تقييم الأمان البيئي للتجارب الحقلية تحت دلائل عملية التقييم البيئي والمراجعة. وزارة الصحة الكندية تنظم وتشرع وتراقب الأغذية ومضافات الغذاء والكيميائيات وغيرها من المنتجات التي قد تؤثر على القيمة الغذائية للأطعمة. وزارة البيئة الكندية تتصح وزارة الزراعة الكندية عن النواحي البيئية وزيادة تحسين جودة البيئة الكندية.

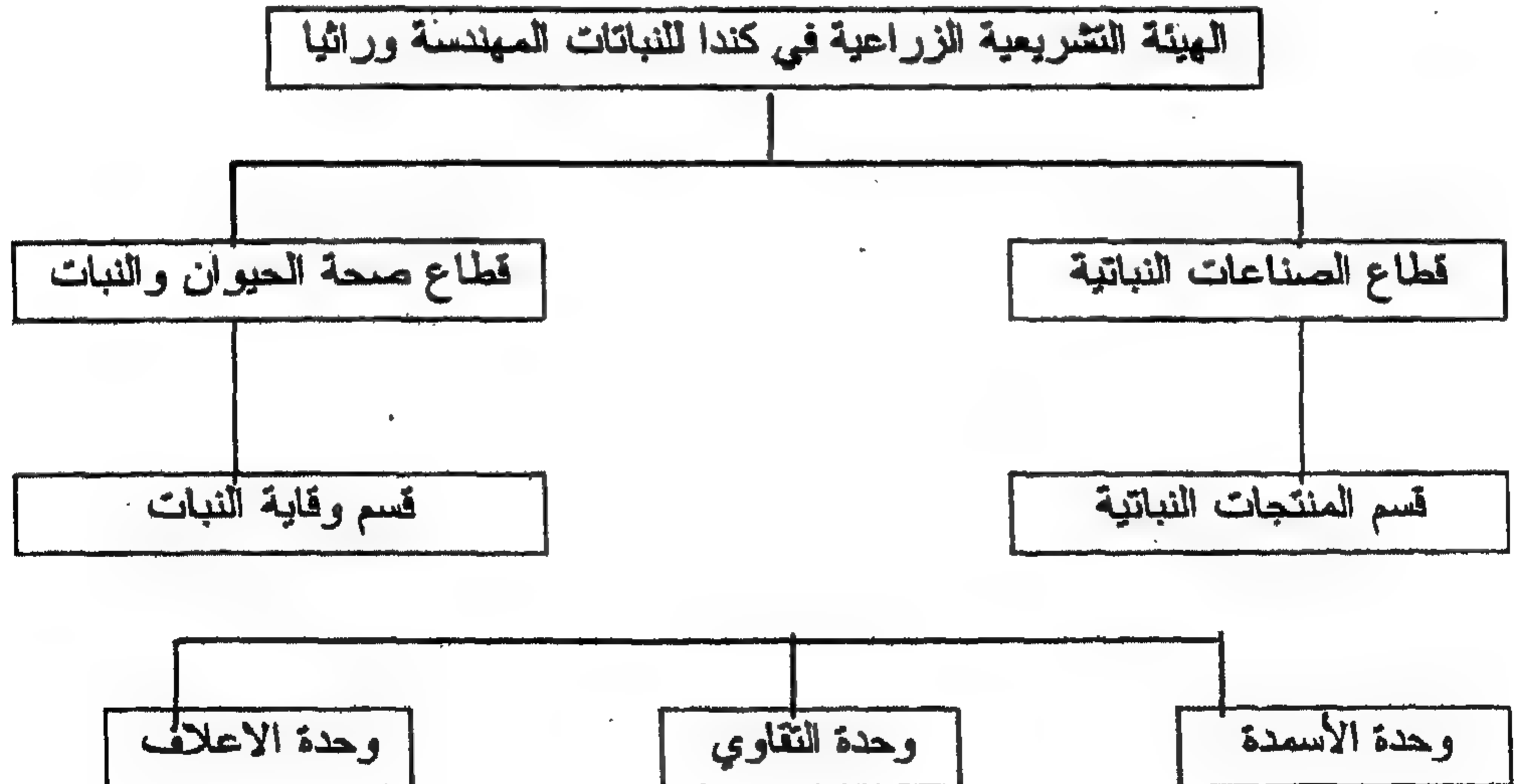
وزارة الزراعة الكندية هي الوكالة القيادية عندما تأخذ في الاعتبار النواحي التشريعية لاستخدام النباتات المحورة وراثيا في الحقل (الشكل ٨-١). لقد طورت اقتراب مرن لتنظيم التعامل مع حزمة القوانين الموجودة. يبنى اقتراب الوزارة على تقييم كل مركب على حدة وتقييم كل حالة بحالتها Case-by-case مع التقييم العلمى للمخاطر المرتبطة بالنشر الحقلى لهذه النباتات المهندسة وراثيا. بناء على هذه المخاطر يتبع نظام

ذو أربعة مراحل للتشريع . استخدام الصوب الزجاجية والمعامل (مرحلة ١-) تعتبر ذات خطر أقل ومن ثم لا تتطلب تشريعات . التجارب الخاصة بالبحوث في نطاق محكم (المرحلة ٢-) تعنى مخاطر متزايدة تتطلب تشريعات أما التجارب غير المحكمة لأغراض البحث (المرحلة ٣-) والنشر التجارى (المرحلة ٤-) كلها تتطلب تشريعات بسبب المخاطر المحتملة منها . منذ عام ١٩٨٨ أجريت ما يزيد عن ٣٠٠ تجربة حقلية فى المرحلة الثانية مع القليل من تجارب المرحلة الثالثة.

الجدول (٣-٨) يلخص أنواع التجارب الحقلية التى ووفق عليها عام ١٩٩٢ وأجريت فى ١٨ موقع عبر كندا .

جدول (٨-١٤): ملخص للتجارب الحقلية التى تمت الموافقة عليها عام ١٩٩٢ فى كندا

| نوع المحصول | عدد التجارب | نوع التجارب | عدد التجارب |
|-------------|-------------|--------------------|-------------|
| البرسيم | ٢ | تحمل مبيد الحشائش | ١٨٥ |
| الكانولا | ١٦٤ | تحمل الإجهاد | ٢ |
| الكتان | ٢٤ | المقاومة للفيروسات | ٨ |
| البطاطس | ١٠ | المقاومة للحشرات | ٤ |
| فول الصويا | ١ | زيادة الزيت | ١ |
| الدخان | ٢ | زيادة البروتين | ١ |



شكل (٨-١): الهيكل التنظيمى المسئول عن النباتات المهندسة وراثيا GMPs فى وزارة الزراعة الكندية .

مسئول تقييم المنتجات النباتية في وزارة الزراعة الكندية له كل مسؤوليات وصلاحيات الموافقة على التجارب الحقلية للنباتات المهندسة وراثيا GMPs تحت قانون التقاوى وقانون وقاية النبات والتشريعات منذ عام ١٩٨٧ . بالإضافة الى ذلك فان قطاع الصناعة النباتية ممثلاً في قطاع المبيدات قبل ذلك في وزارة الزراعة الكندية قد يتطلب موافقات للتصريح بإجراء البحوث تحت قانون منتجات مكافحة الآفات والتشريعات . وزارة الزراعة الكندية هي المنوطة بالموافقة على حركة استيراد التقاوى أو الأجزاء النباتية وكل نشر النباتات المهندسة وراثيا وإصدار متطلبات الأمان للتجارب الحقلية والتفتيش على مواقع النشر خلال فترة ومراحل الاختبارات للتأكد من أن ظروف التجريب الموضوعية قد أتتعت . قبل إصدار الموافقة يجب استكمال كل النواحي الخاصة بالتقييم البيئي والبيانات المرجعية (EARP) . التقييم البيئي يتطلب تحليل التأثيرات البيئية مع خريطة تفصيلية للموقع في النظام البيئي الحيوي المحيط بمكان إجراء البحث وكذلك توفر أربعة مراتب عريضة من المعلومات :

المقدرة على التنبؤ بالسلوك والتأثيرات (يشمل تقييم الكائن وتركيبه وبقاؤه ونموه وتكاثره ونقل الجين والانتشار وتأثيراتها والتأثير على النظام الحيوي والنظم البيئية).

القدرة على استكشاف الكائن الحي .

القدرة لاحتواء الكائن .

القدرة على التحكم والسيطرة على التجربة بما فيها استكشاف الموقع لسنوات عديدة بعد التجربة .

بالإضافة الى ذلك فان مسئولى حكومات الولايات تحاط علما ويطلب منها إبداء الرأى من خلال السلطات التشريعية الموجودة عندها عن موقع نشر النباتات المهندسة وراثيا فى الحقول (Kalous and Duke ، ١٩٨٩) . المنظمات التى تشترك فى النشر الميدانى للنباتات المهندسة وراثيا يجب أن تستخدم اقتراب شديد القوة والعقلانية فى مجال الأمان البيئى . هذا يتضمن التخطيط للحركة واحتواء الموقع والتخلص من النفايات والبقايا وإجراءات الطوارئ لمجابهة التسرب وحوادث النشر العرضى غير المطلوب . لا يسمح بحصاد أى محصول من نباتات التجارب الخاصة GMPs واستخدامها فى الغذاء أو الأعلاف التجارية دون إذن وتصريح مسبق من وزارة الصحة الكندية .

إن وحدة التقاوى التابعة لقسم المنتجات النباتية فى وزارة الزراعة الكندية مسئولة عن إعطاء الموافقات عن تسجيل الأصناف النباتية الجديدة وبيعها فى كندا . يتم الموافقة

على الأصناف الجديدة بعد أن تحقق كل المتطلبات المفيدة merits خلال سنوات عديدة من المقارنات بين التجارب التعاونية بغرض التسجيل . خلافا لما هو موجود في أمريكا حيث لا توجد تشريعات خاصة بدخول الصنف النباتي الجديد أما في كندا تشترط التشريعات أن إدخال أى صنف جديد من المحاصيل الرئيسية (فيما عدا المحاصيل البستانية) بغرض التجارة في كندا يتطلب أن يسير في خطوات التسجيل من خلال التجارب التعاونية . في السنوات الحديثة دخلت الكانولا المهندسة وراثيا مجال التجارب التعاونية من خلال شركة مونسانتو جى تى كانولا (التى تحمل مبيد الحشائش جليفوسات وهو يحتوى على المادة الفعالة لمبيد الراوند - أب) والكانولا التى تتحمل الباستا من خلال شركة هوكست (تتحمل المبيد جلافوسينات وهو المادة الفعالة لمبيد الحشائش باستا) . لقد تم خلق موقفين جديدين . الأول يتمثل في عدم وجود رؤية أولية عن التحمل لمبيدات الحشائش كمرتبة مفيدة في الجمعيات . حتى يمكن الاستجابة لهذا الموقف وافقت اللجنة الغربية الكندية للكانولا ولجنة التوصيات بزيت الشلجم (Wcc / PRC) على قبول معلومات إضافية على صورة بيانات من القطاع الخاص توضح ماهية وفوائد تحمل هذه النباتات لمبيدات الحشائش ومع هذا ظل غير واضح ما إذا كان التحمل لمبيد الحشائش يقدم مرتبة خاصة من الفوائد .

السؤال يتمثل في أن وجود النباتات المهندسة وراثيا GMPs تستند بالضرورة أن تقوم وزارة الزراعة الكندية بتحديد مناطق وظروف عازلة وطرق للتخلص وتحطيم النباتات والتى لم تكن مطلوبة من قبل . في البداية وقبل وضع هذه التشريعات كانت البذور الناتجة من هذه التجارب تباع على المستوى التجارى . منذ أن كانت النباتات المهندسة وراثيا بدون تنظيم أو تشريع على نفس منوال النباتات الناتجة من البرامج التقليدية للتربية ثم تحويل العمليات التعاونية .

في هذا الوقت لم تكن وزارة البيئة الكندية مشتركة بشكل مباشر في الاختبارات الحقلية للنباتات المهندسة وراثيا . بناء على قانون وكالة حماية البيئة الكندية (CEPA) لا تشترك وزارة البيئة الكندية في أية تشريعات طالما كانت هناك وكالات أخرى معنية بالموضوع . إذا ظهر أى دليل يشير الى أن البيئة الكندية غير محمية يكون هناك إجبار لأخذ دور فعال . بالرغم من عدم إشراكها في إعطاء الموافقات والتصريحات ومتابعة أداء الاختبارات الحقلية فإن وزارة الصحة الكندية لا تشترك عن قرب في تطوير النباتات المهندسة وراثيا GMPs من منظور أمان الغذاء والأعلاف . تحت مظلة تشريعات الغذاء والدواء وكذلك CEPA فإن وزارة الصحة الكندية تفرض وتضع سلطات لتنظيم التعامل مع الأغذية والأعلاف الناتجة من خلال الهندسة الوراثية . لقد أصدرت هذه الوزارة حديثا

مقترح على صورة خطاب معلومات يوضح بالتفصيل خطة الوزارة لتنظيم التعامل مع هذه الأغذية (وزارة الصحة الكندية ، ١٩٩٢) . تتمثل الخطة في تقييم الأغذية وعمليات التجهيز الجديدة والتي لابد وان تسبق تسويق الأغذية والأعلاف من الكائنات المهندسة وراثيا . تتوافق هذه التشريعات مع الدلائل التي وضعت حديثا في المملكة المتحدة والتي تشترط تشريعات مبنية على التجهيز . هذا التعارض مع الدلائل التي اقترحت حديثا من قبل هيئة الصحة العالمية WHO , OECD وهيئة الغذاء والدواء الأمريكية (FDA) . تقوم السلطات الصحية الكندية حاليا بمراجعة المعلومات بناء على المدخلات العامة الواسعة من الجهات المهتمة بالموضوع وكذلك رجالات وهيئات الصناعة والتي تتطلب تسويق مع الدلائل الدولية .

التشريعات في الولايات المتحدة الأمريكية

يتم تنظيم التعامل مع النباتات المهندسة وراثيا GMPs والأغذية الناتجة منها بواسطة وكالتان فيدراليتان في أمريكا. هذه الولايات تشمل وزارة الزراعة الأمريكية (USDA) وهيئة الغذاء والدواء الأمريكية FDA. هناك هيئة ثالثة تتمثل في وكالة حماية البيئة الأمريكية (EPA) والتي عندها مسؤوليات وصلاحيات تنظم التعامل مع المبيدات سواء استخدمت على النباتات أو أنتجت منها. دور الوكالات في مجال النباتات المهندسة الوراثية يتمثل في تطوير النباتات التي تعبر عن البروتينات القاتلة للآفات مثل بروتينات بكتريا باسيليس ثورينجينسيز (B.t). كل هذه الوكالات لها مسؤوليات تشريعية مستقلة وتوجهات وقوانين مختلفة. الفلسفة العامة للتشريع فيما بين كل الوكالات يتمثل في استخدام الاقتراب المبنى على النواحي العلمية على أساس كل حالة بحالتها. لقد اتفق ووفق على أن طريقة التحول ذات تأثير قليل على أمان المنتج. لقد أصدرت كل وكالة في الوقت الراهن مقترحاتها وأفكارها لتنظيم التعامل مع النباتات المحورة وراثيا ومنتجاتها الغذائية والمبيدات التي تنتج بواسطة النباتات.

قسم متابعة صحة الإنسان والحيوان (APHIS) يتبع وزارة الزراعة الأمريكية تنظم حركة ونشر النباتات المهندسة وراثيا وأجزائها تحت سلطات ممنوحة لها من قانون الآفات الزراعية والحجر الزراعي. تقوم APHIS بإعطاء التصاريح والموافقات لاستيراد والحركة بين الولايات أو نشر النباتات الناتجة من اقتراب الحمض النووي "الدنا" المتحول. الموافقات غير مطلوبة للتصدير. عندما تحتوي النباتات على مادة وراثية ناتجة من آفة نباتية فأنها تعتبر وتأخذ في اعتبارها المواد والفقرات التشريعية (الاستثناء الوحيد حتى الآن هو نبات أرابيدوبسيس ثاليانا المحور وراثيا والتي تعفى من التشريع). البيانات المطلوبة

للحصول على تصريح بنشر النباتات المهندسة وراثيا تشمل الكائن المانح، وصف الناقل، التعبير عن الصفة المرغوبة، الغرض من النشر، المواقع، البروتوكولات عدد الإدخالات، مقاييس الاحتواء والتخلص منها. التصريح بالحركة المحدودة بين الولايات والاستيراد يتطلب بيانات مختلفة تشمل مواصفات المادة الخاضعة للتصريح وحركتها والأصل ومحطة الوصول لكل الشحنات ووصف إمكانات الاحتواء ووصف الحاويات التي تستخدم خلال الشحن. كل ولاية تشترك بعملية التصريح. الطلب الخاص بالسماح بتداول النباتات المهندسة وراثيا GMPs ينسق بواسطة مدير الإدارة بمساعدة موظفي مكتب الأمان الحيوى وتراجع بواسطة فريق التكنولوجيا الحيوية الخاصة بفرع النباتات فى APHIS.

قبل السماح بالاتجار يجب ان تقوم هيئتي USDA/APHIS بالتحديد أن النباتات المهندسة وراثيا ليست آفة ومن ثم لا تخضع التشريعات تحت القانون CFR340 7 (١٦) يونيو، ١٩٨٧). التوصيات والمعلومات التي يجب نشرها فى هذا التحديد نشرت فى مسودة (خدمات التفتيش لصحة الحيوان والنبات) تشمل:

١. عقلانية تطوير النباتات المهندسة وراثيا.
٢. وصف وراثية والوضع التقسيمى وصفات التلقيح وحشائشية المحصول.
٣. وصف نظام التحول والتتابعات التشريعية المستخدمة للحصول على النباتات.
٤. وصف الجينات المانحة.
٥. تحليل الأداء الوراثى والزراعى.
٦. التتابعات البيئية لإدخال النباتات المهندسة وراثيا GMPs.
٧. أية معلومات غير مستحبة كذلك التى تؤثر على التقديرات.

بحلول يناير ١٩٩٣ قامت شركتان بنشر وثيقة لتحديد الحالات التى لا تستدعى تشريعات من النباتات المهندسة وراثيا. لقد ووفق على إصدار شركة Caalgers لصنف الطماطم ® Flavr Savr بينما تم تعليق وثيقة شركة Asgrow الخاصة بالكوسة المقاومة للفيروس (من قبل خدمات التفتيش على صحة الحيوان والنبات، ١٩٩٢ c,b).

لقد تم تقديم طلبات وصلت للمئات الى وزارة الزراعة الأمريكية تطلب التصريح بإجراء اختبارات حقلية على النباتات المهندسة وراثيا GMPs. يزداد هذا العدد سنة بعد أخرى بمعدل يؤدي الى التصفية فى APHIS لأن عمليات التصريح الحالية تتطلب الكثير من الاهتمام. بالتبعية قامت وزارة الزراعة الأمريكية USDA بنشر مقترح مبنى على

الخبرات التي تجمعت لديها خلال سنوات في مجال التصاريح بالنشر الحقلية لهذه النباتات المحسورة وراثيا والتي إذا اتبعت ستقل بشكل معنوي كمية المراسلات والأوراق الواجب تقديمها قبل التجارب الحقلية. لقد شمل هذا الاقتراح عملية الإحاطة والمعرفة الكاملة عن النباتات المهندسة وراثيا قبل نشرها تؤكد أن هذه النباتات استوفت المعايير المطلوبة. في البداية يجب أن نتأكد أن النبات واحد من الأنواع التالية: الذرة والقطن والبطاطس وفول الصويا والدخان والطماطم أو أي صنف أو نوع نباتي والتي تشير تقديرات الوكالة المعنية إلى الأمان من حيث التكنولوجيا الحيوية والبيولوجيا وحماية البيئة. أية ظروف إضافية يجب أن تتضمنها وثائق واستمارات التسجيل خاصة تلك التي توصف بشكل كامل مواصفات النباتات المهندسة وراثيا. طريقة وخطوات إجراء التجربة الحقلية يجب أن تبلغ كتابة لهيئة APHIS قبل الزراعة. هذا المقترح يعد تغيير كبير عما هو جاري في الوقت الراهن وسوف يؤدي إلى إصدار نداء APHIS تحت عنوان "القيود غير الضرورية على إدخال المواد الخاضعة للتشريع بناءً على الخبرات المتوفرة" في ٣١ مارس ١٩٩٣ تم نشر السياسة النهائية مع بعض التحوير على فترة الإحاطة. الإحاطة تتطلب ٣٠ يوما قبل النشر وعشرة أيام قبل حركة البذور المهندسة وراثيا.

هيئة الغذاء والدواء FDA تشترك في التشريعات الخاصة بالمنتجات الغذائية من النباتات المهندسة وراثيا GMP المطلوب إدخالها للتسويق التجاري ولكنها لا تشترك مباشرة في التجارب الحقلية. لقد نشرت FDA حديثا مقترحا يشمل مجموعة من الدلائل تعتمد على النواحي العلمية للتشريع للتصريح بتداول الأغذية والأعلاف المشتقة من النباتات المهندسة وراثيا. لقد اقترحت الهيئة اقتراب مبنى على نوع المنتج بما يتوافق مع ما هو معمول به مع النباتات العادية غير المحسورة وراثيا. على غرار الدلائل الأخرى المقترحة من الوكالات الأمريكية توجد فترة ٩٠ يوم للمناقشة وإبداء الرأي لدى العامة. تأخذ وكالة FDA هذه الآراء لتغيير المقترحات الموضوعية أو تعديلها.

الوكالة الحكومية الثالثة المشتركة في الاختبارات الحقلية للنباتات المهندسة وراثيا GMPs في أمريكا هي وكالة حماية البيئة الأمريكية EPA. في الوقت الراهن تقوم هذه الوكالة بالتشريع وتنظيم التعامل مع المبيدات تحت مظلة القانون الفيدرالي للمبيد الحشري والفطري ومبيدات القوارض (FIFRA) والخاص بأي مادة أو مخلوط من المواد المقصود بها الاستخدام بهدف منع أو تحطيم أو طرد أو القضاء على أي آفة. تقوم الوكالة كذلك بتحديد ما إذا كانت بعض النباتات المهندسة وراثيا تقابل وتتمشى مع هذا التعريف وإذا كانت تدخل في التشريع من قبل FIFRA كمبيدات نباتية. المبيد النباتي Plant-

pesticide يعرف على أنه : مواد تكافح الآفات تنتج في النباتات وأن إعادة الوراثة ضرورية لإنتاج هذه المواد . بالإضافة الى ذلك تقوم الوكالة بتحديد ما إذا كانت العلامات الوراثة المختارة سوف تنظم تشريعيا كمكونات خاملة . كمثال فان القطن المحور لإنتاج بروتين بكتريا B.t والمعلم المنتخب الديومايسين فوسفوترانسفيراز (npt II) يجب أن أو هو فعلا تحت مظلة تشريعات وكالة EPA . ينظر لبروتين B.t على أنه مبيد والمعلم nptII كمادة خاملة . يستبعد من تحت سلطة الوكالة النباتات المهندسة وراثيا GMP التي غيرت من التركيب الغذائي والتحمل لمبيدات الحشائش الكيمائية وغيرها من تغييرات طعم وقوام الأغذية . لذلك فان مبيدات الحشائش وغيرها من كيميائيات مكافحة الآفات والتي تستخدم مع نباتات GMPs سوف تستمر تحت التشريع من قبل وكالة حماية البيئة الأمريكية EPA .

الاختبارات الحقلية الموسعة في مساحات أكبر من ١٠ أكر (٤ هكتار) والتي تتضمن المبيدات النباتية تتطلب بضرورة الحصول على موافقة وكالة EPA على التجريب في هذا المستوى (EUP) . البيانات المطلوبة للحصول على موافقة EUP ترتبط بنوع الطلب المقدم . يمكن إجراء التجارب تحت مفهوم " Crop destruct " إذا كان الاختبار بهدف التجريب فقط والمنتج لن يصل بأى حال من الأحوال الى المستوى التجارى . أما إذا كان المنتج سوف يسوق تجاريا يجب تقديم ما يفيد بالسماح المؤقت أو الكامل أو الاعفاء المؤقت أو الكامل من متطلبات السماح . عندما تؤخذ الوثيقة من EUP تقوم وكالة حماية البيئة الأمريكية EPA باستعراض الاستخدامات على ضوء التأثيرات المعاكسة الخطيرة على البيئة .

المعلومات المطلوبة للحصول على الموافقة والتصريح من قبل EPU .

١. المبررات العقلانية التي تشمل المنتج المقصود وتوضيح أسباب الرغبة في إجراء الاختبار.
٢. وصف كامل للنبات ومرتبته التقسيمية وغيرها.
٣. البيولوجيا الجزيئية والكيمياء الحيوية الجزيئية والتعبير عن البروتين الجديد وتوصيف الجين وأصل الكائن المأخوذ منه.
٤. الناقل وطريقة التحول.
٥. حجم الاختبار واحتياطات الأمان وحركة المواد.
٦. احتياجات أمان أخرى مثل التخزين والتداول وطرق التخلص من النباتات المتحورة.

بمجرد رضی وقبول وكالة حماية البيئة الأمريكية EPA من أن النبات المبيد لا يسبب أية أضرار معاكسة معنوية على البيئة يتم إصدار وثيقة التصريح في الحال. على غرار USPA و FDA قامت الوكالة EPA بإصدار دلائل للتشريع الخاص ببعض النباتات المهندسة وراثيا والتي يطلق عليها المبيدات من النباتات. تعتقد الوكالة ان غالبية المبيدات من النباتات عندها المقدرة الدنيا لإحداث تأثيرات عكسية غير محتملة على الإنسان والبيئة. هذا المقترح يوضح موقف وكالة EPA لتنظيم وتشريع التعامل مع المبيدات النباتية ذات الأخطار الكبيرة.

هذه تشمل مواصفتان عامتان:

١. اقتدار عالي لإحداث تعرض عالي متميز للكائنات غير المستهدفة .
 ٢. بسبب تقنية الفعل فان لها مقدرة عالية للأضرار بالكائنات غير المستهدفة .
- الاهتمامات تتركز على التشريع على المكونات الناتجة بواسطة النباتات التي لها طريقة إحداث فعل سامة وتخلق تعرض جديد للكائنات الدقيقة غير المستهدفة. المكونات المتطابقة داخل الجنس النباتي لا تحتاج لتشريع جديد. الدلائل الخاصة بها لا تتطلب التشريع للنباتات التي يكون فعلها الوقائي لحماية النباتات من خلال التقنيات التي تتضمن حواجز طبيعية مثل الكيوتيكل والتعبير عن المكونات الطبيعية الموجودة فعلا في النوع في مستويات مقارنة. في حالة النباتات المهندسة وراثيا التي تعبر عن بروتينات غلاف الفيروس فان وكالة حماية البيئة الأمريكية عندها قناعة وارتياح من إنه لن يحدث تعرض جديد أو مخاطر جديدة (وكالة حماية البيئة الأمريكية - إصدار عام ١٩٩٢).

الدول الأخرى

هناك إحساس وشعور في المجتمع الأوربي بالحاجة الى التنظيم في مجال سياسة إدارة المخاطر المرتبطة بالاختبارات الحقلية للنباتات المهندسة وراثيا GMPs. لقد اتخذت خطوة إيجابية عندما تم نشر المركز الذي يدير نشر الكائنات الحية المهندسة وراثيا في البيئة (EEC ، ١٩٩٠) والتي تشمل GMPs. يقوم هذا المركز بطلب خطوات مرجعية موحدة بين الدول الأوربية. هذا يعني أن الدول الأوربية سوف تطلب نفس المعلومات لتعصيد النشر المقترح لهذه النباتات. هذه المطالب ستكون في واحدة من استمارتين بناء على الطرق من الاختبار. الأولى عبارة عن طلب تجريب والثانية، خاصة بالاستخدام التجاري. لقد اتفق على النشر بغرض التجريب سيكون محدودا وفي نطاق صغير وتحت السيطرة والإدارة مع أقل قدر من المخاطر وبدون أية إصدارات تجارية لذلك فان الموافقة

على هذا النشر تشمل ضرورة تقديم دوسيه كامل للدولة التي سيجرى فيها الاختبار. السلطات المسؤولة في الدولة التي سيجرى فيها التجارب سوف تقوم بتوزيع الدوسية على كل دول الاتحاد الأوربي للنصح وإبداء الرأي ولكن السلطات المخولة في الدولة هي التي ستقوم باتخاذ القرار ووضع الحكم النهائي عن نشر هذه النباتات المهندسة وراثيا. بسبب أن الإصدارات التجارية تكون مصاحبة للنشر التجاري فإن نفس العملية الابتدائية للتصريح بالتجريب ونشرة واجبة الإجراء ولو أن القرار النهائي من سلطة اللجنة المنسقة للاتحاد الأوربي. الثقة والاعتماد الأول على مدخلات السلطات الخاصة بالتجريب والتي تقوم بتقييم المخاطر على أسس علمية فإن اللجنة التنسيقية تتطلع الى المصادقية والعقلانية. في حالة تذبذب وعدم وضوح رؤية وقرار السلطات الأولى المنوطة بالموافقة على التجريب فإن القرار النهائي يصبح مسئولية اللجنة الاستشارية للاتحاد الأوربي والتي يجب أن تستند لتفصيلات من الأسس العلمية تعضد القرار. بعد استلام طلب التجريب يكون أمام اللجنة ٩٠ يوما للقبول أو طلب معلومات إضافية عن نشر التجريب. في حالة النشر التجاري يضاف ٣ شهور أخرى للجنة الاستشارية لاستكمال الدراسة المتأنية للدوسيهات والوصول الى اتفاق. هناك اتفاق عام بين كل دول الاتحاد الأوربي حول سياسة نشر النباتات المهندسة وراثيا على مستوى دول السوق.

اليابان من الدول التي تتخذ حيلة كاملة نحو تنظيم وتشريع الاختبارات الحقلية ويبدو أنها تأخرت في تطور السياسة التشريعية الخاصة بتجريب ونشر النباتات المهندسة وراثيا. في الوقت الحالي يتطلب الحصول على الموافقة على إجراء الاختبارات الحقلية في اليابان توفير بيانات كاملة من دراسة شاملة في حجم النمو وبتبعها تجارب الصوب الزجاجية. يجب أن تجرى هذه التجارب في اليابان كما يجب أن تقدم البيانات وتراجع قبل اتخاذ أي قرار خاص بالنشر الميداني الحقلية وبعبارة. الاختبار الحقلية الأول يتطلب أن تكون القطع التجريبية كاملة الزراعة لتقليل المخاطر البيئية. مع تعليق نتائج هذا الاختبار قد يستوجه أحد الطالبين للحصول على موافقة لإجراء مزيد من النشر التقليدي للنباتات المحورة وراثيا. اليابانيين يقومون في الوقت الراهن بوضع مسودة دلائل لأنهم على دراية كاملة بالمنتجات التي ستصبح متاحة من خلال الهندسة الوراثية وهي GMPs كما أنهم لا يريدون خلق أية حواجز تجارية مع الدول المصدرة.

النواحي البيئية Environmental aspects

التوجه نحو قبول الاختبارات الحقلية للنباتات المهندسة وراثيا GMPs يختلف ويتفاوت. من المناقشة التي ذكرت قبلا يتضح أنه بينما تختلف التوجهات إلا أن أنواع الأسئلة والأساس العلمي لاتخاذ القرارات متضمنة الإجابة عن نفس الأسئلة الأساسية. في كل الوثائق التي تعضد GMPs تتم مناقشة ثلاثة نواحي:

العقلانية في تطوير المنتج وإجراء الاختبار والفوائد المرجوة .
التأثيرات البيئية .

التأثير على أمان الإنسان والحيوان .

للحكم على التأثيرات البيئية للنباتات المهندسة وراثيا يجرى تقييم بيئي والذي يتطلب معلومات:

أ- حركة الجينات (انتشار اللقاح وكفاءة العبور الخارجي) .

ب- الصفة وتأثيرها على إيكولوجية النبات (التأثير على اللياقة في البيئة، كفاءة وقدرة الغزو والمقدرة الحشائشية) وكذلك التأثيرات الثانوية والتي تعرف على أنها تأثيرات غير ممكن التنبؤ بها على الهندسة الوراثية مثل مستويات تغيير نواتج التمثيل (الممثلات) الثانوية.

ت- أمان منتجات الجين تجاه الكائنات غير المستهدفة واستخداماتها .

ث- مقدرة وعظم المشاكل البيئية غير المرغوبة فيها (حركة الجين من خلال تقنيات أخرى بخلاف التقنيات داخل النوع).

تجدر الإشارة في هذا المقام التركيز على النواحي البيئية لنوعين من النباتات المهندسة وراثيا والتي أختبرت على امتداد سنوات عديدة في الحقل وفي مناطق متعددة. الأول هو القطن المقاوم للحشرات (IRC) والثاني هو الكانولا (لفت الشلجم) الذي يتحمل مبيد الحشائش جليفوسات أي الكانولا المقاوم للجليفوسات (Canola GTC). في هذا المقام يجب التذكير بثلاثة موضوعات ترتبط بشكل واسع بالنواحي البيئية للنباتات المهندسة وراثيا. الأول يتمثل في إمكانية نقل هذه الجينات خلال الأحياء بشكل عشوائي وما بين الأنواع مما يثير نوعان من الانتقادات. بينما هناك إمكانية خلال التطور فإن اتجاه حركة الجين يمكن أن تحدث فإن كل الأدلة تشير أن حركة الجينات من النباتات إلى الكائنات الدقيقة أو للأنواع غير المرتبطة بالنباتات محتملة الحدوث (Goodman and Newell، ١٩٨٥). العديد من الأمثلة عن إنسياب الجين حتى بين الأنواع المتوافقة يمكن أن تفسر من خلال التطور المتقارب. هذه الحركة العشوائية للجين تظل مثيرة للاستطلاع حتى يمكن

إثبات شيء مخالف من التجريب. الثانى أن معظم التغيرات الوراثية تقل أكثر منها تزيد من اللياقة (Crawley، ١٩٩٢). الأنواع والطرز الوراثية البرية عادة تكون أكثر لياقة وتكون منافسات قوية وكذلك تكون أكثر حشائشية. حيث أن معظم التغيرات الوراثية تسوى النبات تحت بعض النواحي البيئية المؤثرة فانه لا يتوقع أن النباتات المهندسة وراثيا GMP سيكون لها اقتدار كبير كان تكون آفة عنه كصنف تجارى يمكن الحصول عليه من خلال التربية التقليدية والانتخاب. فى النهاية لا يوجد أى دليل على الإطلاق من أن الثبرات الناجية المشتقة من الأجروباكتيريوم تومى فيسيانس عديمة الأذرع التى تعول التحولات (Irc aand GT Canola) (Huttrer وآخرون، ١٩٩٢). هذا يوضح أن الكائن يقل بدرجة كبيرة فى مزارع الأنسجة ولا يتضاعف فى البذور.

ثانيا: نظرة سريعة عن ملامح الأمان الحيوى فى مصر للمستحضرات الحيوية والنباتات المهندسة وراثيا

عندما تناولت التشريعات الخاصة بالنباتات المهندسة وراثيا والكائنات الدقيقة كذلك فى الدول المتقدمة وأهمية الأمان الحيوى كان لا بد أن أبحث عن هذا الأمان فى مصر لأننا مهينين تماما ومستهدفين لدخول هذه التكنولوجيا الجديدة من الخارج أو من معاملنا الى الزراعة المصرية والبيئة المصرية . لذلك توجهت الى أخى وصديقى العزيز أ.د. مجدى مذكور مدير معهد بحوث الهندسة الوراثية الزراعية بمركز البحوث الزراعية التابع لوزارة الزراعة أسأله العون والمشورة. لقد تفضل سيادته بإعطائي نسخة من نظام ومحددات وتشريعات "تأسيس نظام قومى للأمان الحيوى فى مصر: الإرشادات والأنظمة" والذي تم إعداده عام ١٩٩٤. سوف أضع فقط بعض نواحي هذا الإصدار كما هو دون تعليق حتى يتأكد القارئ الكريم أننا نتواكب مع متطلبات الأمان على نفس المستوى إن لم يكن أفضل من الدول المتقدمة.

تحصل تطبيقات التقنية الحيوية موقعا متميزا فى التوسع العلمى الكبير خلال هذا العقد. ولما كان إنتاج وانتشار نواتج الكائنات الحية المعاملة بالهندسة الوراثية قد أثار احتمال تعرض الإنسان والبيئة للمخاطر لهذا كان يتعين أن تجرى كافة بحوث التقنية الحيوية فى إطار ضوابط منظمة للأمان الحيوى. تعنى هذه الوثيقة بإنشاء نظام قومى للأمان الحيوى فى مصر بهدف تقديم دليل لمساعدة صانعى السياسات فى إنشاء أنسب نظام قومى للأمان الحيوى حيث لا يتوفر هيكل يلائم هذا النظام حاليا. وقد تم إعداد الهيكل المقترح للنظام القومى ويتضمن المرفقات الإرشادات الخاصة بالأمان الحيوى بعد تطويرها بمعرفة المنظمات العالمية المتخصصة.

إن إقامة مثل هذا النظام سوف يؤكد استمرار التقنية الحيوية فى أمان دون تعريض العاملين والمجتمع والبيئة لأية مخاطر محتملة.

مقدمة :

المقصود بالتقنية الحيوية أى تقنية تستخدم الكائنات الحية أو مستخرجاتها فى تطوير أو تحسين إنتاج المحاصيل والأغذية والأدوية ومستلزمات الرعاية الصحية والأمصال والصناعات الكيماوية ومنسجاتها كما ونوعا وتتدرج هذه التقنيات بين التقنيات الحيوية التقليدية واسعة الانتشار والتقنيات الحديثة التى تعتمد على طريقة إدماج الحامض النووى الديوكسى ريبوزى المعاد تجميعه (r- DNA) والتى تعرف بالهندسة الوراثية. وتتضمن

أغراض استخدام نواتج الكائنات الحية الدقيقة المطورة وراثيا للسيطرة على الأمراض ومبيدات الحشائش في الزراعة وإنتاج اللقاحات وتطهير النفايات من الكيماويات السامة والترشيح الميكروبي للخامات المعدنية وتحسين استخلاص الزيوت البترولية. وتكتسب النباتات المعاملة بالهندسة الوراثية عدة مزايا منها زيادة المقاومة للأمراض ومبيدات الحشائش، تحمل الجفاف والظروف البيئية الأخرى الغير ملائمة، تقليل الفاقد من المواد الغذائية أثناء التخزين والنقل وزيادة القيمة الغذائية للمنتجات الغذائية.

الآمان الحيوى

يستخدم هذا المصطلح في شرح السياسات والطرق المتبعة في تأمين التطبيقات الأمانة للبيئة للتقنيات الحيوية الحديثة. ويكتسب سعة الانتشار بقدر ما تسعى كثير من الدول للإفادة من التطبيقات العلمية الحديثة في الزراعة والطب والبيئة دون أن تتعرض الصحة العامة والآمان البيئي للخطر.

وقد أسست العديد من الدول الصناعية الأنظمة الخاصة بقواعد التقنية الحديثة، كما قامت اللجنة الاستشارية بمعهد الصحة القومي (NIH) بتطوير أساليب اختبار وتقييم الآمان للتجارب المقترحة ونشرت إرشادات مكثفة للشروط التي يقتضى عندها إجراء نماذج من التجارب المتنوعة. وتقتصر إرشادات معهد الصحة القومي على الاستخدام المعملى لمادة r-DNA دون إطلاق الكائنات المعاملة وراثيا الى البيئة ويتضمن المرفق رقم "١" إرشادات معهد الصحة القومي.

ولما كان اختبار الحامض النووى الديوكسى ريبوزى المعامل بالهندسة الوراثية يجب أن يجري خارج المعمل فهناك طريقة تعرف بالإطلاق المتأنى Deliberate أو الإدخال المخطط Planned introduction لإدخال هذه الكائنات المعاملة فى البيئة مما قد تنشأ عنه بعض المخاطر المصاحبة لتمرير هذه الكائنات المعاملة بالهندسة الوراثية.

أسئلة تتعلق بالتعريف بالأخطار التى تنشأ عن إطلاق الكائنات الحية الدقيقة فى البيئة:

- هل يمكن ان ينشأ مصادفة عن استخدام تكنولوجيا r-DNA أمراض وبائية جديدة للنبات؟
- هل يقود استخدام r-DNA الى تحويل الكائن غير المرضى الى كائن ممرض بمحض الصدفة؟
- هل من الممكن انتشار الجين المستحدث فى الأوساط الميكروبية؟

- هل هناك تأثير للكائنات الحية الدقيقة المعاملة بالـ r-DNA على إحداث تغير بالتجمع الميكروبي للتربة ؟
- حددت الأكاديمية القومية الأمريكية للعلوم (NAS) المخاطر الناتجة عن إطلاق الكائنات المعدلة بالهندسة الوراثية فيما يلي :
- ليست هناك أية شواهد تنبئ عن وجود خطر واحد سواء من استخدام تقنيات r-DNA أو من نقل الجينات بين كائنات متباينة .
- تتماثل المخاطر المصاحبة لإدخال الكائنات المعاملة بالهندسة الوراثية من حيث النوع - بتلك المصاحبة لإدخال كائنات غير مطورة أو الكائنات المطورة بطرق أخرى .

في خطوة لاحقة دعت منظمة الأمم المتحدة للتنمية الصناعية (UNIDO) الى عقد اجتماع لمجموعة من الخبراء بفيينا في مارس ١٩٩١ ضم عشرين خبيراً يمثلون النواحي الأكاديمية والصناعية والحكومات من الدول النامية والمتقدمة والمنظمات الدولية لإعداد مسودة دستور (أو مجموعة مبادئ) تحكم التداول الآمن واستخدام وإطلاق الكائنات الحية المعدلة التركيب الوراثي في البيئة وذلك في محاولة لإيجاد تجانس بين الإرشادات القائمة واقتباس الحد الأدنى من المبادئ المقبولة على المستوى العام وتقديم إطار عمل دولي في صورة مجموعة مبادئ لإطلاق الكائنات الحية المعاملة بالهندسة الوراثية، وذلك بهدف إقامة الحد المقبول من التعاون الدولي اللازم.

وقد على بأن تكون هذه الإرشادات التي تم التعبير عنها في هذا الكود صديقاً للمستخدم بغرض: تنشيط مراحل التقنية الحيوية وتقديمها والتي يمكن تطويرها أو إمتدادها لتتلائم مع حالات بعينها تبعاً لرغبة كل دولة ويتضمن المرفق رقم (٢) الـ Code of conduct هذا الكود.

ولقد وجهت الدول النامية أيضاً بالطلب المتزايد على إدخال أبحاث الحامض النووي الديوكسي ريبوزي المعاد تجميعه r-DNA ونتيجة للحاجة العاجلة للمجتمع العلمي لتوفير المشورة لكل من الباحثين والمنظمين في مجال تقييم المخاطر المصاحبة للتقنية الحيوية. لهذا يتعين إنشاء نظام قومي للأمان الحيوي في إطار التنظيم القائم والمعاهد العلمية المتوفرة والأفراد والتشريعات الحالية بأكثر قدر استطاع بحيث يقدم الآليات المناسبة لكل من التطبيقات المحتواه وغير المحتواه بما يضمن أمان المنتجات المستخدمة فيها أساليب التقنية الحيوية مثلما هو الحال باستخدام التقنية الحيوية التقليدية.

هذا ويتطلب إعداد سياسة قومية لقواعد أبحاث الـ r-DNA في الدول النامية توفر العناصر التالية :

- ١- إيجاد هيكل قومي تنظيمي مع توفر الدعم المالي، ويتألف الهيكل التنظيمي من:
 - أ- لجان الأمان الحيوى التى تتكون منها السلطة التنظيمية .
 - ب- مجموعة من التشريعات الخاصة بالأمان الحيوى والقواعد والإرشادات التى يجب اتباعها .
- ٢- إتاحة التمويل والخبرات العلمية والفنية المناسبة لتحليل قيم المخاطر وأشكالها .
- ٣- التنسيق مع المنظمات الدولية .
- ٤- تحديد آلية لتجميع المعلومات الخاصة بالظروف الزراعية والبيئية المحلية .
- ٥- أنظمة لمتابعة تطور التقنية الحيوية التى قد تؤثر على صحة العاملين وسلامتهم.
- ٦- توفر الثقة فى خبرة صانعى القرار .
- ٧- أنظمة لتوفير المعلومات والتوعية اللازمة للجمهور .

تقدم هذه الوثيقة مقترحات خاصة للسياسات والإجراءات التى قد ترغب السلطات الوطنية فى الأخذ بها عند إنشاء نظام الأمان الحيوى، كما تتضمن اقتراح هيكل تنظيمي وأمثلة لطرق تقييم المخاطر والإرشادات الملائمة للبيئة المصرية.

ومرفق طيه المستويات المقبولة دوليا لمجموعة المبادئ مع تقديم أمثلة للبحث مقيمة فى إطار الإرشادات. ومما يجدر ذكره أن جميع هذه البنود تقدم وتناقش كامثلة لخطة متناسقة لنظام الأمان الحيوى. كما أنه من الأهمية بمكان الإشارة الى ان هذا العرض عكس مختارات بسيطة من العدد الكبير من الآليات المستخدمة دوليا على نطاق واسع لأغراض الأمان الحيوى.

ختاماً تجدر الإشارة الى أن المخاطر التى قد تتعرض لها صحة الإنسان والبيئة لا تقتصر على التقنية الحيوية بوجه خاص، بل أن هذه الأسئلة قد طرحت كعنصر هام فى مجال تقنية وتنظيم والارتفاع بمستوى المنتجات باستخدام أكثر من التقنيات القديمة والحديثة مثل الكيماويات والمستحضرات الدوائية.

أصبح إقامة نظام قومي للأمان الحيوى ضرورة ملحة نتيجة الزيادة السريعة فى إدخال تطبيقات التقنية الحيوية فى مصر. إن إقامة منظومة أمان حيوى قومي مع ضمان الالتزام بقواعدها يحقق الآتى:

- ١- التأكيد على استمرارية التقنية الحيوية بصورة آمنة دون تعريض العاملين والمجتمع والبيئة لأية آثار ممكن تجنبها .
- ٢- تسهيل الوصول الى التقنيات الحيوية الحديثة المبتكرة بالخارج حيث أن كثير من المعاهد الدولية والشركات لا تقوم باختبار كائنات حية معاملة بالهندسة الوراثية إلا بعد الموافقة عليها من جهة حكومية مسئولة .
- ٣- سرعة تقبل المجتمع مع ما يتبعه ذلك من مزيد من التنمية للتقنية الحيوية الحديثة .

المبادئ الأساسية لإعداد سياسة قومية لتنظيم التقنية الحيوية

١. المراجعة الدورية لإبراز الخصائص والمخاطر التي تم التعرف عليها لمنتجات التقنية الحيوية دون الاقتصار على الطريقة التي أحدثتها بصفة أساسية.
٢. يجب أن تكون مراجعة التقنية الحيوية التي يتعين مراجعتها مصممة على أساس معايير الكفاءة والتأثير مع التأكيد على حماية الصحة العامة وأمان البيئة .
٣. يراعى أن تستكمل الاحتياجات التنظيمية للتقنية الحيوية الحديثة في إطار قواعد المنظومة الشاملة التي تحكم عملية إدخال منتجات جديدة في القطاع الزراعي.
٤. أن درجة معرفة سلوك الكائنات المثيلة عند إطلاقها في البيئة يجب أن تحدد مستوى التنظيم المطلوب بحديثه الأدنى والأقصى اعتماداً على درجة المخاطر التي تم التعرف عليها .
٥. يتعين أن تكتسب برامج المنظومة المرنة والقدرة على سرعة التكيف مع المعلومات الجديدة والتقدم السريع في التقنية الحيوية .

الجزء الأول: لجان الأمان الحيوى

إن إنشاء لجنة استشارية قومية للأمان الحيوى يعتبر الخطوة الأولى في تطوير السياسات الملائمة والإجراءات الخاصة بالتقنية الحيوية، حيث تقوم هذه اللجنة بسرعة وضع السياسات وتحديد الإجراءات التي تحكم استخدام التقنية الحيوية الحديثة في البلاد.

١- اللجنة القومية للأمان الحيوى (National Biosafety Committee (NBC)

شكلت لجنة مصيرية قومية للأمان الحيوى تضم أعضاء من واضعي السياسات والمصممين والخبراء العلميين في الزراعة والصحة والبيئة من الحكومة والمعاهد الأكاديمية للبحوث .

الجزء الثاني: إرشادات (احتياطات) الأمان الحيوى

١- تقدير أو تقييم المخاطر

إن مدى تعرض صحة العاملين والآخرين بالقرب من مكان العمل هو العنصر الرئيسى الهام فى تقدير المخاطر المصاحبة لاستخدام الكائنات الحية المحورة وراثيا. هذه المخاطر تتناسب مع مجال وطبيعة العمل وكل الأجهزة المنظمة تفضل الاستخدام المحدود لها فى مجال البحث والتنمية.

أما الاستخدام الواسع النطاق الذى قد يسبب خطورة على الصحة أو البيئة المحيطة وزيادة المخاطر المحتملة بالبيئة عندما قد يحدث تسرب الكائن الحى من منطقة الإنتاج لذلك فإنه يجب استخدام طرق أخرى أكثر صرامة لاحتواء هذه الخطورة. الاحتواء ممكن أن يكون عملا طبيعيا ومثال ذلك الحواجز التى تحد من تسرب الكائنات الحية أو احتواء حيويها ومثال ذلك التحكم الفسيولوجى فى حيوية وتضاعف وتكاثر الكائن خارج البيئة الأصلية.

فى عام ١٩٨٩ وضعت الأكاديمية الدولية للعلوم (NAS) الأسئلة الثلاثة التالية للحكم على درجة الخطورة:

هل نحن ملمين بخواص الكائن الحى والبيئة المحتمل استقدامه إليها ؟

هل نستطيع أن نتحكم فى الكائن الحى بكفاءة ؟

ما هى التأثيرات المحتملة على البيئة وهل الكائن الحى أو الخاصية الوراثية

المستقدمة تبقى لوقت أطول من المتوقع أو تنتشر بالبيئة الغير مستهدفة ؟

إن التكنولوجيا الحديثة تثير العديد من الأسئلة على درجة الخطورة والتى تقتقر الى

قلة أو انعدام المعلومات التى تساعد فى تقييمها .

والتعريف المقترح يكون :

الخطر = احتمالية الخطورة × درجة الخطورة

كما شرح مسبقا أن التكنولوجيا الحيوية تهدف الى إنتاج محاصيل بخواص جديدة

مفيدة للجنس البشرى وهذا يعنى إذا كان هناك أى زيادة فى الخطورة يجب أن يتوازن مع

المنفعة الناتجة من المحصول الجديد وسنعتبر الخطر بأنه الخطر المقبول.

احتمال المخاطرة × درجة الخطورة

الخطر المقبول =

المنفعة من المنتج

وحتى يتسنى لنا فهم الظروف التي يمكن أن تؤدي إلى تحول نبات معدل التركيب الوراثي إلى حشيشة ضارة أو ذو تأثير ضار على البيئة ، فإنه يجب معرفة تأثير العوامل في الموديل التالي:

معدل زيادة النبات المعدل التركيب الوراثي في بيئة معينة = معدل نمو وتكشف

النبات

- + إنتاجه للبذور (الوقت والمدة)
- + بقاء الأجزاء الخضراء حية (مطروح منه معدل الموت)
- تأثير المنافسة مع النباتات الأخرى من نفس النوع
- تأثير المنافسة مع الأنواع الأخرى من النباتات
- تأثير الآفات الزراعية (الحشرات والفقريات)
- تأثير الفطريات وأمراض النبات الأخرى
- + هجرة البذور المنقولة وراثيا من أماكن أخرى
- + معدل إنتاج النباتات المعدلة التركيب الوراثي من بذور ساكنه في التربة

يجب أن تقسم الظروف التي يجري تحتها البحث بالكائنات الحية المحورة وراثيا بأمان بالمقارنة مع الظروف المقبولة طبيعيا لإجراء بحوث على الكائنات الحية الأصلية (الابوية) .

وعلى ذلك فإن تقييم الأمان يكون ضروريا لتحديد مستوى العمل الآمن .

٢- تحديد مستوى العمل الآمن LSC

أوصت اللجنة الاستشارية لبحوث التكنولوجيا الحيوية الزراعية بخطوات متدرجة للسكرتير المساعد للعلوم والتربية لتقييم مستوى العمل الآمن للكائنات الحية المحورة وراثيا والتي تنقسم إلى ثلاث مستويات وتحديد مستوى العمل الآمن ذو أهمية عظمى لتحليل خطورة استخدام الكائنات المحورة وراثيا على صحة الإنسان والنظام البيئي الطبيعي .

الخطوة الأولى:

تحديد مستوى العمل الآمن للكائنات الأصلية (الابوية) والتي تعتمد على خاصيتين هما :

١. درجة الخطورة على صحة الإنسان والبيئة المحيطة أو النظام البيئي الطبيعي.

٢. القدرة على التعامل أو التحكم في الكائن الحي أثناء استقدامه المخطط إلى البيئة وبناءاً عليه يجرى البحث بطريقة آمنة .

المستوى الأول للعمل الأمني للكائنات الحية الأصلية (الابوية)

الكائن الحي يؤدي إلى خطر قليل للصحة وليس هناك خطر غير معقول على البيئة المعاملة أو النظام البيئي الطبيعي. هذه الكائنات الحية والتي لها مساهمات بيئية في البيئة الخاصة المستقبلية تكون مفهومة.

بعض المساهمات في الخليط ممكن أن تشير إلى المستوى الأول هي:

١. ليس هناك تاريخ لآثار سيئة في البيئة المستقبلية.
٢. قدرة ضئيلة على التحور لتصبح كائنات حية ضارة في البيئة المستقبلية (سهولة الوصول).
٣. احتمال ضئيل لبقائها في البيئة المستقبلية (سهولة الوصول).

المستوى الثاني للعمل الأمني للكائنات الحية الأصلية (الآباء)

الكائنات الدقيقة والتي لها مساهمات بيئية في البيئة المستقبلية ممكن أن تؤدي إلى خطورة مع صحة الإنسان والتي ليست بالضئيلة أي ممكن تؤدي إلى ضرر أو خطورة غير معقولة للنظام البيئي الطبيعي والتي يمكن ويجب أن تعامل وتحكم بواسطة حصر مناسب (وضع مناسب).

المستوى الثالث للعمل الأمني للكائنات الحية الأصلية (الآباء)

الكائنات الحية التي لها صفات بيئية في البيئة المستقبلية يمكن أن تؤدي إلى خطورة على الصحة الأدمية والتي ليست بصورة ضئيلة أو تؤدي إلى خطر غير معقول للبيئة المعاملة أو النظام البيئي الطبيعي. وليس هناك حصر يمكن إجراءه ليؤكد أن التطبيق الآمن للبحث خارج الإمكانيات المتوفرة.

بعض الخصائص التي تحدد المستوى الثالث للأمان للكائنات الحية هي :

١. ثبات لتأثير ضار على البيئة المخصصة .
٢. القدرة على البقاء والانقسام في البيئة .
٣. ليس له حالة مستقرة في البيئة .

٤. كثرة تبادل المعلومات الوراثية مع تأثير ضار .
٥. افتقاد الطرق المؤثرة للحد من انتشار أو تسرب الكائنات الحية .
٦. افتقاد الطرق الكافية للسيطرة أو منع حالات الانتشار .

الخطوة الثانية : تحديد تأثير التغيرات الوراثية على مستوى العمل الأمنى
يجب أن يقيم التغيرات الوراثية على أساس تأثيرها على صفة الكائن الحي الأصيل (الابوى) والتي قد تم تقييمها فى الخطوة الأولى. حيث أن التحور الوراثى قد لا يكون له تأثير على الأمان أو يتطلب زيادة الأمان الحيوى.

تأثير التحور الوراثى على الأمان يجب أن يقيم على الأسس التالية :

١. تأثير مباشر للكائن الحي على صحة الإنسان أو البيئة .
 ٢. تأثير غير مباشر للكائن الحي من خلال المواد التى ينتجها .
 ٣. تأثيرات التبادل الوراثى مع الكائنات الحية الأخرى .
- فى الخطوة الثانية يجب على الباحثين أن يفحصوا طريقة التحور الوراثى والخواص الجزيئية وثبات الجينات المحورة والتعبير والوظيفة وتأثيرات الجينات المحورة .

النوع الأول: التحور الوراثى الذى يقلل العمل الأمنى للكائنات الحية المحورة
التحورات التى تمنع أو تعوق نشاط الجين أو الجينات المسئولة عن الصفات مثال ذلك: القدرة على إحداث المرض والخصوبة والبقاء والتلاعم بطريقة تؤدي الى زيادة الأمان للكائن الحي .

النوع الثانى: التحور الوراثى الذى ليس له تأثير على العمل الأمنى للكائن الحي المحور
يتطلب ذلك دراية واعية بالبيولوجية الجزيئية والعلوم الأخرى التى تطلب الخبرة المناسبة والسبب توضح أن التحور قد تم توصيفه جيدا وأن وظيفة الجين وتأثيره قد تم استيعابها لتوقع الأمان .

التحورات تشمل :

١. إدخال أو حذف أو إعادة ترتيب جزء من الأحماض النووية والذى ليس له أى عواقب فى المظهر الخارجى أو الوراثى فى البيئة .

٢. إدخال أو حذف أو إعادة ترتيب الأحماض النووية التي لها عواقب متوقعة في المظهر الخارجي أو الوراثة في البيئة وغير مرغوبة وممكن أن تؤدي إلى تأثير ضار إضافي إلى الصحة الأمية والبيئة .

النوع الثالث: التحور الوراثة الذي يزيد العمل الأمني للكائن الحي المحور تشمل التحورات ما يلي :

١. إدخال أو حذف أو إعادة ترتيب الأحماض النووية التي تؤثر على تعبير الجينات ولكن الوظائف أو التأثيرات ليس مفهومة بصورة كافية بالتأكد ما إذا كان الكائن الحي المحور يؤدي إلى خطر أكبر من الكائن الحي الغير محور .
٢. إدخال أو حذف أو إعادة ترتيب الأحماض النووية والتي لها عواقب معروفة أو متوقعة في الشكل الظاهري أو الوراثة في البيئة التي تؤدي إلى آثار سيئة إضافية على صحة الإنسان والبيئة .

الخطوة الثالثة: تحديد مستوى العمل الأمني للكائنات الحية المحورة وراثيا

تصنف الكائنات الحية المحورة وراثيا تبعا لدرجة الأمان الحيوي المطلوبة إلى ثلاث مستويات تبعا لتأثير التحور الوراثة على خصائص أو صفات الكائن التي تأثرت وقد تؤدي إلى تغير مستوى العمل الأمني للكائنات الحية المحورة بالمقارنة بالكائن الحي الغير محور.

- مستوى العمل الأمني للكائن الحي المحور وراثيا يعتمد على نفس الخصائص المطبقة لتقدير أو تحديد مستوى العمل الأمني للكائن الحي الأصلي (الأبوي).
المستوى الأول (الكائن الحي الأصلي)

المستوى الأول للعمل الأمني للكائن الحي الأصلي مع النوع الأول من التحور يعتبر LSC-1 للكائن الحي المحور وراثيا .

المستوى الأول للعمل الأمني للكائن الحي الأصلي من النوع الثاني من التحور يعتبر LSC-2 للكائن الحي المحور وراثيا .

المستوى الأول للعمل الأمني للكائن الحي الأصلي من النوع الثالث من التحور يؤدي إلى LSC-3 , LSC-2 , LSC-1 كائنات حية محورة وراثيا تعتمد على درجة العمل الأمني كالاتي :

١. إذا كان التحور من النوع الثالث يؤدي الى زيادة طفيفة في العمل الأمني وعليه الخطر لصحة الإنسان تبقى طفيفة أو مهمة والخطورة للبيئة المعاملة أو النظام البيئي الطبيعي . تبقى معقولة بدون الاحتياج الى مقاييس منع وعليه تبقى الكائن الحي المحور وراثيا LSC-1.
٢. إذا كان التحور من النوع الثالث يؤدي الى زيادة العمل الأمني للدرجة التي فيها الخطورة لصحة الإنسان ليست مهمة أو الخطر للبيئة أصبح ليس معقول ولكن الحصر الممكن إجراءه والمتاح لإجراء البحث مع وجود خطورة ضئيلة على صحة الإنسان والبيئة ومن ثم الكائن الحي المحور يكون LSC-2 .
٣. إذا كان التحور من النوع الثالث يؤدي الى زيادة العمل الأمني للدرجة التي يكون فيها الإدخال للبيئة غير مستطاع التعامل معه أو التحكم فيه بصورة كافية لتحقيق خطورة ضئيلة على صحة الإنسان وخطورة معقولة على البيئة . ومن ثم يكون الكائن الحي المحور يكون LSC-3 .

المستوى الثاني للكائن الحي الأصيل (الأبوي)

١- المستوى الثاني من العمل الأمني للكائن الحي الأصيل من النوع الأول التحورات تؤدي الى LSC-1 أو LSC-2 للكائن الحي المحور وراثيا تتوقف درجة العمل الأمني على ما يلي :

أ - لو كان التحور من النوع الأول يقلل العمل الأمني الى الحد الذي يؤدي فيه الكائن الحي الى خطورة منعدمة أو ضئيلة على صحة الإنسان وخطورة معقولة على النظام البيئي المعامل أو الطبيعي . بدون الحاجة الى مقاييس حصرية وعليه يكون الكائن الحي المحور وراثيا LSC-1 .

ب- لو كان التحور من النوع الأول يقلل العمل الأمني والخطورة على صحة الإنسان تكون منعدمة والخطورة على النظام البيئي الطبيعي أو المعامل تكون معقولة فقط عندما تعامل باستخدام المقاييس الحصرية وعليه يكون الكائن الحي المحور وراثيا LSC-2.

٢- المستوى الثاني من العمل الأمني للكائن الحي الأصيل من النوع الثاني المحور يظل LSC-2 كائن حي متحور وراثي . مقاييس حصرية مناسبة ضرورية لنشر المخطط في البيئة.

٣- المستوى الثانى من العمل الأمنى للكائن الالى الأصيل من النوع الثالث المحور ينتج فى LSC-2 أو LSC-3 كائن حى محور وراثى . تعتمد على درجة الزيادة فى العمل الأمنى كالاتى :

- أ - إذا كان المستوى الثالث للتطور يرفع من درجة الأمان الحيوى ولكن الإدخال المخطط للبيئة يظل ممكن معاملته أو التحكم فيه بواسطة قياسات حصرية مناسبة ومن ثم يكون الكائن الحى المحور وراثيا LSC-2 .
- ب- إذا كان النوع الثالث للتطور يرفع درجة العمل الأمنى للدرجة التى يكون معها تأكيد غير معقول بأن الإدخال المخطط فى البيئة يمكن أن يعامل أو يحكم . ومن ثم يكون الكائن الحى المحور وراثيا LSC-3 يجرى البحث تحت مقاييس حصرية حتى يكون هناك تأكيد بأنه يحكم بأسلوب آمن .

المستوى الثالث للكائنات الحية الأصلية (الأبوية)

المستوى الثالث للعمل الأمنى للكائن الحى الأصيل من النوع الأول المتطور يؤدى الى كائن حى محور وراثيا LSC-3 , LSC-2 , LSC-1 معتمدا على درجة التقليل فى العمل الأمنى كما يلى :

١. لو كان النوع الأول من التطور يقلل العمل الأمنى الى الدرجة التى فيها الإدخال المخطط فى البيئة يؤدى الى خطورة منعدمة أو قليلة على صحة الإنسان خطورة معقولة على النظام البيئى المعامل أو الطبيعى وعليه يكون الكائن الحى المحور وراثيا LSC-1 .
٢. لو كان النوع الأول من التطور يقلل العمل الأمنى ولكن المقاييس الحصرية تكون ضرورية للإدخال المخطط فى البيئة مع خطورة منعدمة لصحة الإنسان وخطورة معقولة للنظام البيئى المعامل أو الطبيعى وعليه يكون الكائن الحى المحور وراثيا LSC-2 .
٣. لو كان النوع الأول من التطور يقلل العمل الأمنى ولكن ليس للدرجة التى يمكن بها معاملة أو التحكم فى الإدخال المخطط للكائن الحى لتحقيق خطورة منعدمة على صحة الإنسان وخطورة معقولة للنظام البيئى الطبيعى أو المعامل ومن ثم وعليه يكو الكائن الحى المحور وراثيا LSC-3 . يجب أن يجرى البحث فى إمكانات متاحة .

- المستوى الثالث من العمل الأمني للكائنات الحية الأصلية مع النوع الثالث أو الثاني من التحور ينتج كائنات حية محورة وراثيا LSC-3 .

٣- احتياطات الأمان الحيوى

احتياطات الأمان الحيوى مصممة للتأكد من أن المنتجات من التكنولوجيا الحيوية ليس لها تأثير على البيئة أو الزراعة وكذلك منع انتشار الميكروبات المهندسة وراثيا من الانتشار العشوائى.

بالإضافة لحماية الجماعات المحيطة المتعاملين والباحثين فى مجال استخدام مثل هذه المنتجات بدءا من مرحلة البحوث حتى التوزيع التجارى .

٣-١- احتياطات الأمان الحيوى بالمعامل

ممنوع تخزين الأطعمة وتناول المأكولات والمشروبات والتدخين.

ممنوع استخدام الماصات التى تستخدم بالفم.

ارتداء الملابس الخاصة بالمعمل إجباريا ويجب أن تخلع قبل الخروج من المعمل.

يجب أن تطهر الأسطح المستخدمة بواسطة الصابون والكحول بعد انتهاء العمل اليومى.

النفايات أو الفضلات يجب أن تظهر بواسطة التعقيم أو الحرق.

تكرار غسل الأيدي إجباريا (على الأقل تواجد حوض واحد لغسل الأيدي)

يجب اجتناب لمس الميكروبات المحورة وراثيا والمواد البيولوجية المستوردة ويجب لبس الجوانتى عند التعامل مع هذه المواد ولا تستخدم هذه الجوانتيات إلا مرة واحدة.

أبواب المعامل يجب أن تكون مغلقة طوال الوقت.

التعامل مع الكيماويات المنتجة للأبخرة داخل المكان المخصص لذلك.

علامات التحذير يجب أن تعلق دائما فى المعامل.

٣-٢- احتياطات أو إرشادات خاصة بالأمان الحيوى للصوبات (البيوت الزجاجية)

- يجب أن تكون الصوب مغلقة دائما .

- درجة الأمان الحيوى وكود ورمز الأمان يجب ان يكون معلق على مدخل الصوبة .

- نظام التهويه يجب ألا يسمح بانتشار حبوب اللقاح أو الميكروبات المحورة وراثيا من الصوب .
- جميع أجزاء النبات سواء حية أو غير حية أو النباتات التي أدخلت في الصوب عن التخلص منها يجب تعقيمها أولا أما إذا كانت ستخزن فيجب أن يكون التخزين في أماكن أخرى مجهزة وفي هذه الحالة يجب مراعاة شروط الأمان وأثناء النقل .
- المياه الناتجة يجب أن تعالج كيميائيا قبل أن يتم تصريفها .
- يجب ارتداء الملابس الخاصة بالصوب طوال الوقت ويجب تعقيم هذه الملابس قبل الخروج من الصوب لأي سبب .
- يجب غسل الأيدي قبل الدخول وعند الخروج من الصوب .
- وجود دواصة مغموسة في مادة مطهرة عند مدخل الصوب .
- تسجيل يومى للتجارب التي تجرى في الصوب .

٣-٣- احتياطات الأمان الحيوى فى التجارب النصف حقلية

- ممنوع إجراء التجارب الحقلية بواسطة آفات نباتية مستوردة وممرضة.
- يجب منع حبوب اللقاح الخاصة بالنبات من الانتشار عن طريق إزالة الزهور.
- يجب أن تغطى الزهور قبل النضج إذا كان هناك حاجة للزهور فى إقامة التجربة.
- تصميم مناسب للعزل يجب أن يقام بحيث يتجنب انتشار الزهور الى مناطق أخرى قريبة.
- ممنوع الدخول فى المناطق المعزولة لغير المسموح لهم .
- يجب أن تتخذ احتياطات خاصة للتأكد من عزل النبات أو أجزاء منه عند الحصاد .
- يجب أن يكون محمى من دخول الحيوانات والحشرات عن طريق عمل أسوار محيطة بالمكان .

تقييم الظروف البيئية

تقييم الظروف البيئية تمثل :

- النتائج العلمية والمعلومات الأخرى من الهيئات الحكومية قبل إصدارها للسماح للاختبارات الحقلية المحدودة والمرتبطة بالنباتات المهندسة وراثيا على أن تجرى فى نطاق اختبار ضيق .

- تقييم الظروف البيئية وتحليل النتائج للتأكد من أن المحاولة الحقلية ذات النطاق المحدود سوف لا تؤدي إلى مخاطرة عند إجراءها وليس لها مغزى على نوعية البيئة البشرية .
- وذلك يتم تقييمه خلال ما يعرف بإيجاد صدمة ليس ذات أهمية . سوف تحدد ما إذا كان السماح يجب أن يصدر أو يمنح على عدة عوامل قليلة. وهناك مثال واضح في المقطع رقم ٤ .

٤- النقط المحتواة المأخوذة في الاعتبار

- هل الكائن الحي المهندس وراثيا له تأثير على المجتمعات النباتية معرض للخطر أو مهدد للكائن الحي والإنسان وصحة النبات والحيوانات وكذلك على المصادر الوراثية (مثال قابلية الأجناس الاقتصادية الهامة للمبيدات الزراعية أو المبيدات الحشرية ، أو الإنتاج الزراعي).
- ما هي معدلات إمكانية الحياة للكائنات المحور في الحالات المتغيرة مثال وجودها في المنطقة متحررة أو البيئة المحيطة .
- ما هي معدلات تكاثر الكائنات في هذه المناطق ؟ ما هي مقدرة الكائنات على الانتشار من المنطقة المنتشرة منها ؟
- ما هي مقدرة الكائنات على الانتشار خارج المنطقة الموجودة بها ؟
- ما هي وسائل الانتشار ؟ وما هي العواقب الناتجة عن وجود هذه الكائنات في البيئة بعد الخطة أو الوقت المخطط له ؟
- ما هي الطرق المستخدمة للتحكم أو التخلص من الميكروبات أو الكائنات الحية من المكان والبيئة المحيطة وهل هذا الإجراء مطلوب ؟ وما مقدرة أو كفاءة هذه الطرق ؟

النبات

انتشار الجينات المهندسة وراثيا بواسطة حبوب اللقاح هو أحد الاهتمامات الرئيسية آخذين في الاعتبار أن يكون التصميم التجريبي ومكانة وحالات الطقس كافية للحد من انتقال الجينات إلى النباتات المتماثلة جنسيا .

الكائنات الحية الدقيقة المصاحبة مع النبات

هل الكائن الحي قادر ليعبر عن نفسه في أو على النوع الغير مستهدف في البيئة المحيطة . السى أى مدى يمكن للكائن أن يعيش ويتكاثر على أو فى النبات المستهدف أو النباتات الأخرى فى المكان المختبر والبيئة المحيطة . هل الخصائص المحسورة وراثيا يمكن أن تنتقل الى كائنات حية دقيقة أخرى فى البيئة.

هل هناك أى تأثير على الكائنات الحية الدقيقة بالتربة والتي تعتبر نافعة للنبات (مثال ذلك الرايزوبيوم وفطريات الميكوريزا) .

هل تستطيع الكائنات الحية الدقيقة المهندسة وراثيا أن تنتشر بواسطة الرياح والماء والتربة والكائنات الحية المتحركة أو بطرق أخرى .

REFERENCES

Abel-Al, Z.E. (1994). The integration of biotechnology for sustainable agriculture and rural development into Arab countries. FAO, Near East Regional Office, Cairo, Egypt. pp. 1-63.

Anon, National Biological Impact Assessment Program (NBIAP) News Report. 1990-91-92-93-94-95. Information Systems Virginia Polytechnic Institute USA.

Compeau, G.C., W.D. Mahaffey and L. Patras, (1991). Full scale bioremediation of contaminated soil and water. Environmental Biotechnology for Waste Treatment, Plenum Press pp. 91-109.

Dowidar, A.M., A.F. Farag, A.H. Abdall, A.M. Ibrahim, ,A. Tanan and M.A. Shaheen. (1994). Biology for Third Year Secondary p. 399.

Economidis, I. (1992). Biosafety research in the European Community: Results and prespectives. International Symposium on the Biosafety Results of Field Tests of Genetically Modified Plants and Microorganisms. pp. 135-140.

El-Nawawy, A.S. and M.H. El-Kattan (1994). The beneficial use of agricultural waste disposal in the Near East (Arabic). FAO Regional Office, Cairo, Egypt. p. 105.

Franklin, F.C.H. (1985). The impact of biotechnology on agriculture Biotechnology News. 5: 7.

Harlander, S.K. and R.G. Garner. (1986). The future of biotechnology in food processing. USDA Yearbook of Agriculture. pp. 52-55.

Jong, S.C. and M.A. Birmingham. (1994). Fungi/yeast as transformation hosts for production of foreing proteins. American Type Culture Collection (ATCC) Quarterly Newsletter 11 pp. 1-11.

Kearney, P.C. (1986). Soil microbes could help clean the environment. USDA Yearbook of Agriculture. pp. 60-61.

Molina, F.I., L. Geletka, and S.C. Jong. (1995). High-resolution DNA fingerprinting of microorganisms at ATCC. American Type Culture Collection (ATCC) Quarterly Newsletter 1: pp. 103.

Papavizas, G.C. and J.E. Loper. (1986). Biotechnology and soilborne diseases. USDA Yearbook of Agriculture. pp. 62-65.

Rochelle, P.a. and B.H. Olson, (1992). Bacterial detoxification of mercury in sediment. International Sympsoium on the Biosafety

Results of Field Tests of Genetically Modified Plants and Microorganisms. Goslar, Germany, pp. 149-152.

Stotzky, G. (1992). Gene transfer among and ecological effects of genetically modified bacteria in soil. International Symposium on the Biosafety Results of Genetically Modified Plants and Microorganisms. Goslar, Germany. pp. 122-134.

Toet, D.A. (1992). Effect of rDNA technology on safety requirements for enzyme production and preparations. International symposium on the Biosafety Results of Genetically Modified Plants and Microorganisms. Goslar, Germany pp. 201-203.

Wong, W.K.R., C.I. Curry, R.S. Parekh, M. Wayman, R.W. Davis, D.G. Kilburn and N. Skipper. (1988). Wood hydrolysis by *Cellulomonas fimi* endonuclease and exoglucanase coexpressed as secreted enzyme in *Saccharomyces cerevisiae* Biotechnology, 6: pp. 713-719.

الباب التاسع

**إنتاج المبيدات الحيوية البكتيرية والفيروسية في
معهد بحوث وقاية النباتات - مركز البحوث الزراعية - مصر**

إنتاج المبيدات الحيوية البكتيرية والفيروسية في معهد بحوث وقاية النباتات - مركز البحوث الزراعية - مصر

بعد ان انتهيت من الأبواب الأساسية في هذا الكتاب تساءلت لماذا لا أشير الى الأنشطة البحثية في مجال المبيدات الميكروبية البكتيرية والفيروسية في مصر وكذلك الانتاج التجاري ان وجد. سألت اخي وزميلي الفاضل أ.د. مجدي مذكور وكيل مركز البحوث الزراعية وهو زميل عزيز اثري البحث العلمي في كليتي الزراعة جامعة الاسكندرية وكذلك جامعة عين شمس في مجالات الهندسة الوراثية والتكنولوجيا الحيوية وترجمت ابحاثه لواقع ملموس ساهم ومازال في منظومة الادارة المتكاملة للآفات بوسائل حيوية امنة اشهرها مستحضر "الاجرين" الذي يعتمد علي بكتريا الباسيلليس ثورينجنسيز بسلالات محلية غير مستوردة اصبحت تأخذ نصيبا من كميات المبيدات المستخدمة في مكافحة الآفات خاصة علي المحاصيل التصديرية كالبطاطس وغيرها ناهيك عن القطن، ان بنبذة عن خلقية وتطور انشاء وحدة بحوث الهندسة الوراثية والتكنولوجيا الحيوية في معهد بحوث الهندسة الوراثية الذي شرف برئاسته لسنوات طويلة تحقق خلالها هذا الانجاز العلمي التجاري الكبير. حتي كتابة هذه السطور لم يسمح وقت زميلنا العزيز بتوفير هذه المعلومات. في نفس الوقت سألت نفس السؤال لاهي وزميلي العزيز د. حسن قاسم محمد نجيب رئيس وحدة انتاج المبيدات الحيوية البكتيرية والفيروسية بمعهد بحوث وقاية النباتات - مركز البحوث الزراعية وقد تفضل سيادته باعطائي تقرير بعنوان "استخدام مكافحة الحيوية للآفات الزراعية في مصر" بتاريخ يوليو ٢٠٠٢ وهو تقرير شامل ووافي يقع في ٥٨ صفحة وقد سمح مشكورا ان استفيد به كاملا او في اجزاء توضع في هذا الكتاب. لقد زاد الكرم ودمائة الخلق من الزميل الكريم د. حسن قاسم من صعوبة موقعي واصبحت في حيرة من امري وتساءلت اليس هذا بالشئ الكثير؟ كانت الاجابة بالموافقة ولذلك اثرت ان استعين بالفقرات التي توضح نشاط الوحدة في المجال البحثي والانتاجي وكل من يريد مزيد من التفاصيل ان يتصل بالوحدة ومديرها العزيز. تناول التقرير اربعة محاور رئيسية يضم كل محور مجموعة من النقاط الهامة:

١. المحور الاول تناول الوضع الراهن لاستخدامات مكافحة الحيوية في مصر.
٢. المحور الثاني تناول الانجازات والتطبيقات الناجحة للمكافحة الحيوية في مصر.

٣. المحور الثالث تناول المشاكل والمعوقات التي تواجه استخدام مكافحة الحيوية في مصر.

٤. المحور الرابع تناول المقترح التطويري لاستخدام مكافحة الحيوية في الحد من تلوث البيئة في مصر.

بعد ان استعرض التقرير وضع الافات وما تحدثه من فقد في الانتاج الزراعي مما يستدعي ضرورة السيطرة عليها ومكافحتها بكل الوسائل الممكنة في منظومة متكاملة مدروسة العناصر والمحددات بما فيها المبيدات تمت الاشارة الي اهم المشاكل التي حدثت بسبب الاستخدام المكثف غير العقلاني للمبيدات في عمليات مكافحة الافات بداية من مقاومة الافات لفعل المبيدات، التأثير علي للأعداء الحيوية، التأثير علي الحشرات الاقتصادية، التأثير علي الحيوانات الاليفة وتلوث المنتجات، التأثير علي الانسان، التأثير علي الثروة السمكية وكائنات التربة النافعة، التأثير علي الطيور البرية والثدييات. اشار التقرير كذلك الي خطورة وضع مخلفات المبيدات في المنتجات الزراعية سواء التي تستخدم مباشرة او بغرض التصنيع وهي اعلي من حدود الامان التي تم تحديدها من خلال اللجان المشتركة من منظمة الاغذية والزراعة ومنظمة الصحة العالمية WHO/FAO والتي نصت علي التوصية بالحد الاقصى للمخلفات ٢ ملجم/كجم^١ المدي الواسع من السلع الغذائية المحتوية علي المبيدات مع تناول يومي من ٠,٠٠٢ وحتي ٠,٢ ملجم/كجم^١ من وزن الجسم. اشار التقرير كذلك الي الاسس التي تضمنتها اتفاقية التجارة العالمية بضرورة الحد من استخدام المبيدات وتقليل التلوث البيئي بها فضلا عن الحصول علي منتجات زراعية خالية من المبيدات بما يتمشي مع قواعد منظمة التجارة العالمية Worled Trade/Organization (WTO) بشأن انتاج وتداول وتصدير الحاصلات الزراعية بين الدول والذي ادي بكثير من الدول الي الاتجاه الي الزراعة الحيوية. بخصوص تصدير الحاصلات الزراعية بين الدول كان لابد علي وزارة الزراعة المصرية ان تتخذ خطوات فعالة نحو ترشيد استخدام المبيدات من خلال برامج مكافحة المتكاملة Integrated Pest Management (IPM) مع الاهتمام بالعمليات الزراعية الاخرى والتقايي المنتقاء وانتاج النباتات المهندسة وراثيا الذي تغير علي اساسه مفهوم مكافحة المتكاملة الي مفهوم سياسة ادارة المحاصيل الزراعية المتكاملة Integrated Crop Management (ICM) والذي اصبحت فيه عناصر مكافحة الحيوية حجر الزاوية Corner Stone مع العمليات الزراعية وانتخاب النباتات المقاومة والمهندسة وراثيا - ومع ظهور العديد من المبيدات

الحيوية فضلا عن التنافس المستمر في تطوير التكنولوجيا في هذا المجال من حيث الانتاج والتربية ومراقبة الجودة وظروف التخزين والتطبيق مع تقدم تكنولوجيا المعلومات الخاصة بتلك المبيدات فان الحاجة ملحة لتوفر النظام الخاص بانتاج وتسجيل وتداول تلك المبيدات علي اسس علمية تحت الظروف المصرية حتي يمكن تجنب اية مخاطر قد تنتج عن تلك المبيدات في المستقبل - ولقد كانت مصر من الدول الرائدة في هذا المجال حيث منعت وزارة الزراعة المصرية استخدام المبيدات في العديد من محافظات الدلتا كالفيوم والوادي الجديد والاسماعيلية والمناطق الحديثة الاستصلاح مثل توشكي والعوينات الامر الذي ادي الي تعاظم خبرات مكافحة الافات .. بالاضافة الي ذلك اتخذت مصر العديد من الخطوات الهامة في مجال ترشيد استخدام المبيدات من اهمها:

أ- مجال تسجيل وتداول المبيدات

أولاً: المبيدات الكيماوية

صدر القرار الوزاري رقم ٦٦٣ لسنة ١٩٩٨ طبقاً لقانون الزراعة رقم ٥٣ لسنة ١٩٦٦ حيث تناول هذا القرار طريقة الحصول علي ترخيص بتشغيل مصنع مبيدات زراعية او غيرها، حيث انه لا بد من الحصول علي موافقة هيئة التصنيع - موافقة جهاز الامن الصناعي - موافقة جهاز شئون البيئة - موافقة وزارة الصحة عن مدي توافر الاستعدادات المطلوبة لحماية العاملين واعتماد نظام الفحص الدوري للعاملين - سجل تجاري مدون به غرض تصنيع المبيدات - رسم هندسي للمصنع - بيان القوي المحركة للمصنع - بيان الاجهزة الموجودة واماكنها - ترخيص من الوحدة المحلية الواقع في دائرتها المصنع - بيان من اللجان الرسمية المنوطة بالمبيدات يتضمن المواد المسجلة التي يتم تصنيعها في المصنع - اقرار بعدم تداول أي تصنيع أي من المبيدات المنتجة الا بعد اجراء التحاليل اللازمة للتحقق من مطابقة المبيد المسجل عليها طبقاً للمادة ١٤ من القرار الوزاري المشار اليه - اجراء اختبارات السمية البيئية الحادة والمزمنة والتاثير علي الاعداء الحيوية وكائنات التربة الدقيقة حتي يتم تصنيف المركب علي حسب درجة خطورته علي الانسان والبيئة المحيطة به وكذلك احتياطات السلامة للمستخدم ضد التسمم وتلوث السلع الزراعية والبيئة كما قسمت المبيدات الكيماوية الي خمسة مجموعات بناءا علي الخطوط الارشادية لهيئة وكالة حماية البيئة الامريكية Environmental Protection Agency (EPA) التالية حسب درجة خطورتها بحيث يجب ان تكون المبيدات التي تسجل في مصر تنتمي للمجموعة (D) المصنفة علي انها غير مسرطنة للانسان او المجموعة (E) التي لا يوجد دليل علي انها مسرطنة للانسان.

ثانيا: المبيدات الحيوية

بالنسبة للكائنات الممرضة والمركبات الحيوية المستخدمة في برنامج مكافحة
الحبوة في مصر فانها تتبع للمجموعات التي قسمت بواسطة وكالة حماية البيئة الامريكية
(EPA, 2001) Environmental Protection Agency والتي تضم ثلاث مجموعات
رئيسية هي:

١. المبيدات الميكروبية Microbial Pesticides.
٢. المبيدات الكيميائية الحيوية Biochemical insecticides.
٣. النباتات التي تحتوي علي مواد واقية Plant-Incorporated Protectant (PIP)

١- المبيدات الميكروبية

تعريف المبيد الحيوي الميكروبي: أي مستحضر يحتوي علي احد الكائنات الحية الدقيقة
مثل البكتريا والطحالب والفطريات والفيروسات او الديدان (حيوانات اولية) في صورة
نشطة او ساكنة (او اجزاء من الميكروب - متجربة) سواء كانت منفردة او مخلوطة معا
وتنتج سموم داخلية او خارجية ذات تاثيرات غير ضارة للانسان او الحيوان او الطيور
والاعداء الحيوية للافات من الطفيليات والمفترسات وكذلك الحشرات النافعة - وتستخدم في
مكافحة الافات التي تصيب المحاصيل الزراعية سواء في الحقل او في المخزن. ينطبق هذا
التعريف علي المبيدات التي تحتوي علي كائنات ميكروبية معدلة وراثيا من خلال الانتخاب
الطبيعي او التي بها تعديل في جيناتها الوراثية.

٢- المبيدات الكيميائية الحيوية

تعريف المبيدات الكيميائية الحيوية: هي تلك المبيدات التي تكون فيها المادة الفعالة من
مصدر طبيعي مثل الفرمونات والهرمونات ومنظمات النمو الحشري والنباتية والمادة
الطاردة والانزيمات وبعض المواد الاخرى الموضحة.

٣- النباتات التي تحتوي علي مواد واقية

يقصد بها النباتات المهندسة وراثيا والتي تحتوي علي الجينات المسؤولة عن انتاج
المواد السامة للكائنات الميكروبية وحتى الان مازالت تلك النوعية من النباتات في مصر

محل اختبار من حيث تأثيراتها السامة للافات وكذلك الدراسات الخاصة بدرجة الامان الحيوي لها بالنسبة للبيئة لم تكتمل بعد وتحتاج الي بعض الوقت.

عموما بالنسبة للمركبات الحيوية نجد ان عدد المركبات الحيوية المعروفة والمسجلة في العالم وصل الي حوالي ١٨٨ مركب تشمل المبيدات الميكروبية (بكتريا - فطر - فيروسات - نيماتودا)، والفرمونات الجاذبة الجنسية، والمستخلصات النباتية تنتجها حوالي ٢٤٥ شركة سواء شركات اساسية او فروع منها وقد واكبت مصر التقدم العالمي في مجال المركبات الحيوية واهتمت بها حيث سجل في مصر حوالي ٢٢ مركب سواء المنتجة محليا او المستوردة كما هو موضح بالجدول رقم (٩-١)، واما عن استخدامات هذه المركبات فهي تستخدم في العديد من المحاصيل ضد الحشرات والاكاروسات حيث ادخلت ضمن برامج مكافحة متكاملة للافات في محاصيل الحقل والخضر والفاكهة والنباتات الطبية والعطرية.

جدول (٩-١): المركبات الحيوية المسجلة وتحت التسجيل في مصر حتي عام ٢٠٠٢

| اسم المركب | صورته وتركيزه | المجموعة التابع لها | رقم التسجيل | الاستخدام |
|--------------------------------------|-------------------------|---------------------|----------------|--------------|
| المبيدات الميكروبية البكتيرية | | | | |
| اجرين | ٦,٥% مسحوق | B. thuringiensis | ٥٨٠ | مبيد حشري |
| ايكوتك-بيو | ١٠% مسحوق | B. thuringiensis | ٥١٩ | مبيد حشري |
| برونكتو | ١٠% مسحوق | B. thuringiensis | ٥٤١ | مبيد حشري |
| دايبل-X٢ | ٦,٤% مسحوق | B. thuringiensis | ٥١٠ | مبيد حشري |
| زنتاري | ٣% مسحوق | B. thuringiensis | ٥٦٩ | مبيد حشري |
| ريزو-ان | ٣٠ مليون جرثومة/جرام | B. subtilis | ٥٧٠ | مبيد فطري |
| المبيدات الميكروبية الفطرية | | | | |
| بيو-فلاي | ٣٠ مليون جرثومة/جرام | B. bassiana | ٥٣٤ | مبيد حشري |
| بيوسكت | ٣٢ مليون جرثومة/جرام | B. bassiana | تحت التسجيل | مبيد حشري |
| بيوكانزا | ٣٢ مليون جرثومة/جرام | B. bassiana | تحت التسجيل | مبيد حشري |
| بالانتا جارد | ٣٠ مليون جرثومة/جرام | Trichoderma | تحت التسجيل | مبيد فطري |
| المبيدات الميكروبية اليبوكيمائية | | | | |
| الفرتميك | ١,٨% مستحلب | ابامكتين | ٤٦٦ | مبيد اكاروسي |
| اسبينوساد | ١,٨% مستحلب | | تحت التسجيل | مبيد اكاروسي |
| الزيوت الطبيعية والمستخلصات النباتية | | | | |
| زيت طبيعي | ٩٥% مستحلب | زيت فول الصويا | ٥٢٨ | مبيد حشري |
| نات - ١ | ٩٦% مستحلب | زيت فول الصويا | ٦٥١ | مبيد حشري |
| ثريولوجي | ٩٠% مستحلب | زيت النيم | ٦٣١ | مبيد حشري |
| نيمكس | ٤,٥% مستحلب | زيت النيم | ٦٢٧ | مبيد حشري |
| الزيوت المعدنية | | | | |
| البيوم | ٨٠% مستحلب | زيت معدني | ١٧٦ | مبيد حشري |

تابع جدول (٩-١): المركبات الحيوية المسجلة وتحت التسجيل في مصر حتي عام ٢٠٠٢

| المركب | صورته وتركيزه | مجموعته | سنة التسجيل | الاستخدام |
|--------------|---------------|-----------|-------------|-----------|
| كيمي - اويل | ٨٠% مستحلب | زيت معدني | ٦٨٤ | مبيد حشري |
| كيموسول | ٩٥% مستحلب | زيت معدني | ٥٤٨ | مبيد حشري |
| مصريونا | ٨٥% مستحلب | زيت معدني | ٢٣٦ | مبيد حشري |
| سوبر مصريونا | ٣٤% مستحلب | زيت معدني | ٢٣٧ | مبيد حشري |
| زيت رويال | ٨٢% مستحلب | زيت معدني | ٨٠ | مبيد حشري |
| زيت ناشيونال | ٧٥% مستحلب | زيت معدني | ٥٤٩ | مبيد حشري |
| زيت الفولك | ٨٢% مستحلب | زيت معدني | ٢٧٩ | مبيد حشري |
| كزد-اويل | ٩٥% مستحلب | زيت معدني | ١٧٤ | مبيد حشري |

ب- مجال تحليل متبقيات المبيدات

أنشأت وزارة الزراعة المعمل المركزي لتحليل متبقيات المبيدات والعناصر الثقيلة في عام ١٩٩٥ بالقرار الوزاري رقم ٦٨٠ لسنة ١٩٩٥ الذي يخول له اصدار شهادات رسمية بالتحاليل التي يجريها باعتباره المعمل الرسمي لوزارة الزراعة بالنسبة لهذه التحاليل. من القواعد الاساسية لانشاء هذا المعمل هو ما يلي:-

١. حماية المستهلك

٢. حماية الصادرات وتشجيعها

٣. مراقبة الواردات

لقد حصل المعمل علي شهادة الاعتماد الدولي Accreditation Certificate من الفرع الفنلندي للمركز الاوروبي لاعتماد المعامل FINAS-EAL وذلك في عام ١٩٩٦ والتي جددت حتي عام ٢٠٠٤ ويطبق المعمل نظام Iso-17025 ووصل عدد العينات التي تم تحليلها في المعمل الي ١٧ الف عينة في عام ٢٠٠١. بالاضافة الي تحليل العينات يقوم العمل بتدريب الكوادر الفنية في مجال تحليل متبقيات المبيدات

ج- مجال مكافحة الافات

عملت وزارة الزراعة والباحثين في مجال وقاية النباتات علي ادخال وسائل اخري غير قاتلة تحت مسميات البدائل او الاقترابات الحديثة في السيطرة علي الافات تحت مظلة

الادارة المتكاملة للآفات (IPM) في مصر ، حيث حدد الانتشار الموسمي للعديد من الآفات الاقتصادية مثل دودة اللوز القرنفلية والشوكية ودودة ورق القطن ... الخ وعلاقة تعداد تلك الآفات بالظروف المناخية لمعرفة أكثر الاجيال خطورة من خلال الوحدات الحرارية Heat Units ولهذا انشأت وزارة الزراعة بالمعاهد البحثية المختلفة العديدة من الوحدات ذات الطابع الخاص التي تستطيع ان تقوم بدور بحثي وانتاجي بما يخدم النواحي التطبيقية في مجال مكافحة الآفات والأمراض من التعاون مع الأجهزة التنفيذية بالمحافظات حتي يسهل نقل النتائج العملية الي ارض الواقع مما يمكن المزارع من المتابعة المستمرة لنتائج تطبيق تلك البحوث ... فعلي سبيل المثال في معهد بحوث وقاية النباتات العديد من الوحدات مثل وحدة انتاج الفرمونات، وحدة انتاج المبيدات الميكروبية البكتيرية والفيروسية، وحدة مكافحة النمل الابيض، وحدة تحليل الفرمونات، وغيرها من الوحدات، ولمعرفة تأثير الظروف البيئية علي التعداد الحشري لمجموع الآفات انشأت وزارة الزراعة محطات الارصاد الجوية الزراعية في أماكن عديدة من محافظات مصر لتمد الباحثين بالبيانات المطلوبة عن العوامل المناخية من الحرارة والرطوبة وعدد ساعات سطوع الشمس والقمر لما لها من اثر ليس فقط علي النشاط البيولوجي للحشرات ولكن في معدل انتشار الأمراض النباتية ولقد انعكس اثر ذلك علي معدل استخدام المبيدات الحشرية والفطرية في مصر حيث خفض استهلاك المبيدات من ٣٠ الف طن متري في التسعينات الي ثلاثة الاف طن متري حيث اعتمدت برامج مكافحة علي العديد من العناصر المتكاملة مثل العمليات الزراعية والفرمونات الجاذبة الجنسية واستخدام المبيدات الميكروبية كما يلي:-

١- استخدام الفرمونات

وجد ان الحشرات تفرز بعض المواد التي تلعب دورا هاما في عملية التزاوج بين افراد النوع الواحد اطلق عليها بالفرمونات الجنسية Sex pheromone ، فعند اطلاق الاناث للفرمون ومن خلال مستقبلات الحس الكيماوية الموجودة علي قرون استشعار الذكور تتجه الذكور الي الاناث لتتم عملية التزاوج لتضع الاناث بيضا مخصب يفقس الي يرقات وتكمل دورة حياة الحشرة. يتم استخدام الفرمونات الجاذبة الجنسية في الاغراض التالية:

- التنبؤ بتعداد الآفة Monitoring
- الانذار المبكر بالاضرار الناتجة عن الآفات
- حصر مناطق انتشار الآفات
- عمليات الحجز الصحي:

تعتبر مصر من البلدان الرائدة في الاستخدام الموسع للجاذبات الجنسية "الفرمونات" في مجال استكشاف تواجد الافات والتنبؤ بظهورها في حقول القطن والعنب والبطاطس وذبابة الفاكهة وكذلك في مجال مكافحة عن طريق احداث خلل في نظام النقاء الذكور والاناث لدودة اللوز القرنفلية ودودة اللوز الشوكية وغيرها.

نظرا لاهمية استخدام الفرمونات الجاذبة الجنسية في التنبؤ بتعداد الافات باستخدام المصائد الجاذبة الجنسية ونظرا لارتفاع سعر كبسولة القرمون المستوردة تم انشاء وحدة انتاج كبسولات الجاذبات الجنسية بالقرار الوزاري رقم ١٤٣ لسنة ١٩٩٥ ، حيث تقوم هذه الوحدة بانتاج كبسولات الفرمونات الجاذبة الجنسية للافات الاقتصادية لاستخدامها في التنبؤ بالكثافة العددية او في تحديد ميعاد الرش سواء بالمركبات الحيوية او المبيدات الكيميائية التقليدية وقد بلغ الانتاج الاجمالي من كبسولات الفرمونات الجاذبة الجنسية الي حوالي ٢٩ مليون كبسولة خلال الفترة من ١٩٩٣ وحتى ١٩٩٩.

٢- استخدام الكائنات الميكروبية في مكافحة الافات

نظرا لان اتجاه وزارة الزراعة هو ترشيد استخدام المبيدات في محاصيل الحقل والخضر والفاكهة فان استخدام الكائنات الميكروبية من بكتريا وفطريات وفيروسات سوف يلعب دورا هاما في الاقلال من استخدام المبيدات لما تمتاز به من التخصص الشديد تجاه عوائلها فقط وعدم الاضرار بالحشرات النافعة قد دفع بجذب الاهتمام بها وادخالها ضمن منظومة مكافحة المتكاملة للافات في مصر، ولقد استعملت العديد من مسببات المرضية للافات لسنوات عديدة وفي مناطق مختلفة من العالم دونما توضيح ثمة تاثير بيئي غير مرغوب فيه، وبالرغم من تلك الحقيقة والكم الهائل من البحوث المتعلقة بهذا المجال في مصر لم تأخذ المبيدات الميكروبية طريقها الي السوق التجاري نظرا لان مسطرة تقييم تلك المبيدات في البداية كانت تعتمد علي الابداء الفورية والتي تعتبر منخفضة بالمقارنة بالمبيدات الحشرية التقليدية وبالتالي كان الاقبال علي استعمالها ان لم يستبعدا فهو محدود للغاية حتي بداية التسعينات، ومع تغير اسلوب مكافحة الافات والتي تعتمد علي جميع الوسائل المتاحة للحد من تعداد الافات والاهتمام بالتاثيرات المتأخرة للمسببات المرضية اعيدت بل وتاكدت الرغبة في استخدام المنسبات الميكروبية في مكافحة العديد من الافات.

لذلك كان من الضروري انشاء وحدة انتاج المبيدات الميكروبية البكتيرية والفيروسية حتي يمكن تطوير البحوث والانتاج الخاص بتلك الكائنات لاستخدامها في مكافحة الافات حيث وجد أن استخدام المركبات التجارية من بكتريا *Bacillus thuringiensis* فضلا عن انها غالبا ما تكون مكلفة وعند استخدامها في مكافحة الافات تحت الظروف المصرية

تختلف فيها النتائج العملية عن النتائج الحقلية وذلك لان الخواص الطبيعية للمنتج التجاري لا تتماشى مع ظروف البيئة المصرية حيث ان الاشعة فوق بنفسجية تلعب دورا هاما في قتل الجراثيم الحية الموجودة في المستحضر والتي يعزى اليها التأثير السام للبكتريا فان تحسين الخواص الطبيعية للمنتج النهائي سوف تساعد كثيرا في زيادة مدة فعالية المركب اثناء التطبيق الحقلى - لذلك كان الهدف من انشاء الوحدة:

- ١- انتاج المبيدات الميكروبية البكتيرية والفطرية.
 - ٢- تحسين صورة المنتج المستخدم في التطبيق الحقلى حتى يتمشى مع ظروف البيئة المصرية مع مراعاة اقل التكاليف مقارنة بالمنتج التجاري المستورد.
 - ٣- البحث عن سلالات جديدة في السبيرة المصرية من بكتريا *Bacillus thuringiensis* وكذلك الفيروسات والفطريات الممرضة للآفات والتي قد تكون فعاليتها على الآفات تفوق فعالية السلالات التجارية.
 - ٤- الحد من استخدام المبيدات وتقليل الاخطار الناجمة عنها سواء للانسان او ممتلكاته.
 - ٥- فتح الاسواق التصديرية للمنتجات الزراعية المصرية وذلك لخلوها من متبقيات المبيدات وبالتالي العملات الاجنبية التي تدعم الاقتصاد القومى.
- فى النهاية فان الاعتماد على الخبرات العلمية بالمعهد في هذا المجال الحيوى الهام والذي سوف يساعد في حل مشكلة العديد من الآفات سوف يؤدي الى ما ياتي:
- ١- زيادة انتاجية المحاصيل الزراعية كما ونوعا وتقليل الفاقد الناتج عن الآفات سواء قبل او بعد الحصاد مما يؤدي الى تقليل الفجوة بين الانتاج والزيادة السكانية المستمرة.
 - ٢- زيادة العملات الصعبة نتيجة تصدير المنتجات الزراعية الخالية من المبيدات وفتح اسواق جديدة امام المنتجات الزراعية المصرية.
 - ٣- تقليل معدل استخدام المبيدات في مكافحة الآفات وبالتالي تقليل الاخطار الصحية التي يتعرض لها الانسان.
 - ٤- الكشف عن السلالات الجديدة من البكتريا والفيروسات والفطريات والتي قد تفوق في قدرتها السلالات التجارية المعروفة والتي من الممكن ان تكون ذات تخصص شديد في مكافحة العديد من الآفات.

الأنشطة البحثية لوحدة إنتاج المبيدات الميكروبية

أولاً: عزل المسببات المرضية الحشرية Entomopathogens isolation

١- البكتريا الممرضة للحشرات:

تتبع البكتريا المستخدمة في مكافحة الآفات البكتريا العصوية Bacilli ومنها بكتريا *Bacillus thuringiensis* التي تحتوي على العديد من الأنواع مثل *B. thuringiensis* kurstaki, aizawa, entomocidus, israelensis, thuringiensis وغيرها من الأنواع وتنتج هذه البكتريا أنواع مختلفة من البروتينات السامة والتي يطلق عليها الدلتا اندوتوكسين -endotoxin والذي يعمل كسم معدي متخصص على اليرقات - فعند تغذية اليرقات على النباتات المعاملة تتوقف اليرقات عن التغذية ثم يحدث تحطيم للخلايا الطلائية للمعدة الأوسط في اليرقات نتيجة انتفاخها وانبعاثها ثم تموت اليرقات ويزداد التأثير السام للبروتكتو على العمرين الأول والثاني، كما يحدث تأثيرات متأخرة مثل فشل اليرقات في التعذير ونشوء العذاري والفرشات الناتجة من تغذية اليرقات على النباتات المعاملة وكذلك تضع الاناث بيض غير مخصب لا يفقس. ترتبط درجة تخصص البروتين للآفات طبقاً لتركيبها الكيميائي ومدى تلائم تلك البروتينات مع الفتحات الموجودة بشعيرات الخلايا الطلائية المبطنة للمعدة الأوسط لليرقات ومدى توفر درجة الحموضة المناسبة بمعدة اليرقة - وتنتج بعض أنواع البكتريا مثل *B. thuringiensis* نوع آخر من المواد السامة - exotoxin والذي يمتاز بسميته العالية للآفات وتأثيراته الضارة للإنسان ولذلك يمنع استخدام السلالات المنتجة لهذا التوكسين.

تم عزل العديد من سلالات بكتريا الباسيلس التي كان من أهمها سلالة بكتريا *Bacillus thuringiensis kurstaki* التي تستخدم في مكافحة العديد من الحشرات التابعة لرتبة حرشفية الأجنحة *B.t israelensis* التي تستخدم في مكافحة البعوض والعديد من السلالات الأخرى الفعالة ضد بعض الآفات ذات الأهمية الاقتصادية هذا وقد تم إنتاج وتطوير المركب الحيوي "بروتكتو" الذي يحتوي على *B.t kurstaki* في صورة مسحوق قابل للبلل يحتوي على ٢٣٠٠٠ جرثومة حية لكل ملليجرام ومسجل بوزارة الزراعة تحت رقم ٥٤١ لسنة ١٩٩٧.

٢- الفيروسات الممرضة للحشرات:

- فيروس فراشة درنات البطاطس (فيروتكتو)

بالتعاون بين معهد بحوث وقاية النباتات (وحدة انتاج المبيدات الحيوية البكتيرية والفيروسية) والمركز الدولي للبطاطس تم انشاء عدد ٤ معامل لانتاج الفيروس المحسب لقرشة درنات البطاطس بمحافظات الغربية والبحيرة باعتبارها من اهم محافظات زراعة البطاطس بمصر هذا بالاضافة الي المعمل الاصلي بمعهد وقاية النباتات.

- فيروس دودة ورق القطن البوليهدروسيس النووي (فيروس) يتم انتاج هذا الفيروس بمعهد بحوث وقاية النباتات في صورة مسحوق قابل للبلل ٤%. تم خلطة مع البكتريا ويتم اختباره هذا العام ايضا ضد دودة ورق القطن تحت الاسم التجاري "بروفيكس".

٣- بالنسبة للفطريات الممرضة لحشرات:
تم عزل العديد من المسببات المرضية الفطرية فعلى سبيل المثال تم عزل فطري *Metarhizium anisoplae* & *Metarhizium flavoridae* من الحشرات الكاملة المريضة والميتة لسوسة النخل الحمراء وتم تعريفها.
كما تم عزل فطري *Beauveria Bassiana* & *Beauveria brongniartii* التي تستخدم في مكافحة الذبابة البيضاء والمن والجاسد - وتم تطوير صورة المنتج التجاري لتلك الفطريات ودرجت ضمن برامج وزارة الزراعة للموسم التجريبي ٢٠٠١ لاستخدامها في مكافحة الذبابة البيضاء والاكاروس في العديد من محاصيل الحقل والخضر.

ثانيا: استخدام التكنولوجيا الحيوية في دراسة خواص المسببات المرضية
لدراسة الخواص المختلفة لمرضات الحشرات (بكتريا - فطريات - فيروسات)
تستخدم الطرق التالية من خلال:

١. تطوير طرق التقسيم المناعي Enzyme linked immunosorbant assay (ELISA).

٢. دراسة البروتين من خلال التفريد الالكتروليتي Gel electrophoresis.

٣. تفاعل البلمرة Polymerase chain reaction (PCR) وعمل الخريطة الوراثية للجينات المستولة عن انتاج المادة السامة (البصمة الوراثية Gene mapping).

ثالثاً: الانتاج الكمي لمرضات الافات الحشرية

بالنسبة للبكتريا والفطريات تم دراسة تأثير مصادر مختلفة من البروتينات والكربوهيدرات والاملاح المعدنية والفيتامينات ودرجة الحموضة والحرارة وثاني اكسيد الكربون والاكسيجين وتحديد نسب البيئات التي تتوفر بالبيئة المصرية بارخص التكاليف حتي يمكن تخفيض قيمة المنتج النهائي.

بالنسبة للفيروسات فيلزم الاعتماد علي العائل الاساسي للفيروس وهو الافة ولذلك لابد من تاسيس معامل لتربية الافة باعداد كبيرة ثم استخدام الطور المناسب للعدوي وهو اليرقة في انتاج الفيروس - ففي حالة فيروس فراشة درنات البطاطس تم تاسيس ٥ وحدات لانتاج الفيروس تحتوي الوحدة علي معملين لاكثر فراشة درنات البطاطس ومعمل لاكثر الفيروس وذلك بنواحي الغربية والبحيرة بطنطا وكفر الزيات والمركز الدولي للبطاطس باعتبارها محافظات اساسية في انتاج البطاطس بالاضافة الي المعمل الاساسي بالقاهرة - وتختص تلك المعامل بانتاج اليرقات المصابة بالفيروس وتجميعها بمعمل وقاية النباتات الذي يقوم بتجهيزها في صورتها النهائية للمزارع (جدول ٩-٢).

خلال الفترة من ١٩٩٥ حتي ٢٠٠١ قامت وحدة انتاج المبيدات الحيوية البكتيرية والفيروسية بانتاج وتطوير العديد من المركبات التي سجل بعضها منها بعد اجراء كافة الدراسات البيئية والفعالية عليها مثل الفيروتكتو والبروتكتو ولازال البعض الاخر تحت الاختبار كما هو موضح بالجدول رقم (٩-٣).

جدول (٩-٢): عدد المتدربين والكميات المنتجة من الفيروس والبكتريا والفرمونات الجاذبة الجنسية لفراشة درنات البطاطس المنتجة واستخداماتها خلال موسم ٢٠٠١

| Trainees | Partici-pants No. | Production of Bt+ & G.V | | Application of Bt+&G.V. | | | |
|------------|-------------------|-------------------------|---------|-------------------------|-------|---------------|------|
| | | | | Field (feddan) | | Storage (ton) | |
| Agronomist | 29 | G.V.* | 2 Milon | B.t. | 300 | B.t. | 4000 |
| Visitors | 5 | B.t. | 300 kg | G.V. | 20 | G.V | 4000 |
| Farmers | 1500 | Pheromone | 250.000 | Phero mone | 5.000 | - | - |

- infected larvae with granulosi virus

جدول (٩-٣): المركبات الحيوية التي تم انتاجها بوحدة انتاج المبيدات الحيوية - معهد بحوث وقاية النباتات.

| الاسم التجاري | صورته وتركيزه % | الاسم الشائع للمركب | المحصول | الآفة |
|---------------|--------------------------------|----------------------------------|---------|------------------|
| بروتكتو | 23×10^6 IU/mg w.p. | B. thuringiensis kurstaki | بطاطس | فراشة الدرنات |
| فيروتكتو | ٤% مسحوق قابل للبلل | Granulosis virus | بطاطس | فراشة الدرنات |
| بروتكتو | 23×10^6 IU/mg w.p. | B. thuringiensis kurstaki | قطن | دودة القطن |
| فيروست | ٤% w.p. | Nuclear polyhedrosis virus | قطن | دودة القطن |
| بروفيكيت | ٥٠+٥٠% w.p. | B.t. + NPV | قطن | دودة القطن |
| بيوفار | 23×10^6 IU/mg w.p. | Beauvaria bassiana | كوسة | ذبابة بيضاء |
| بيورانزا | 23×10^6 IU/mg w.p. | Metarhizium anisoplae | خيار | اكاروس |

رابعاً: تجهيز المنتج التجاري

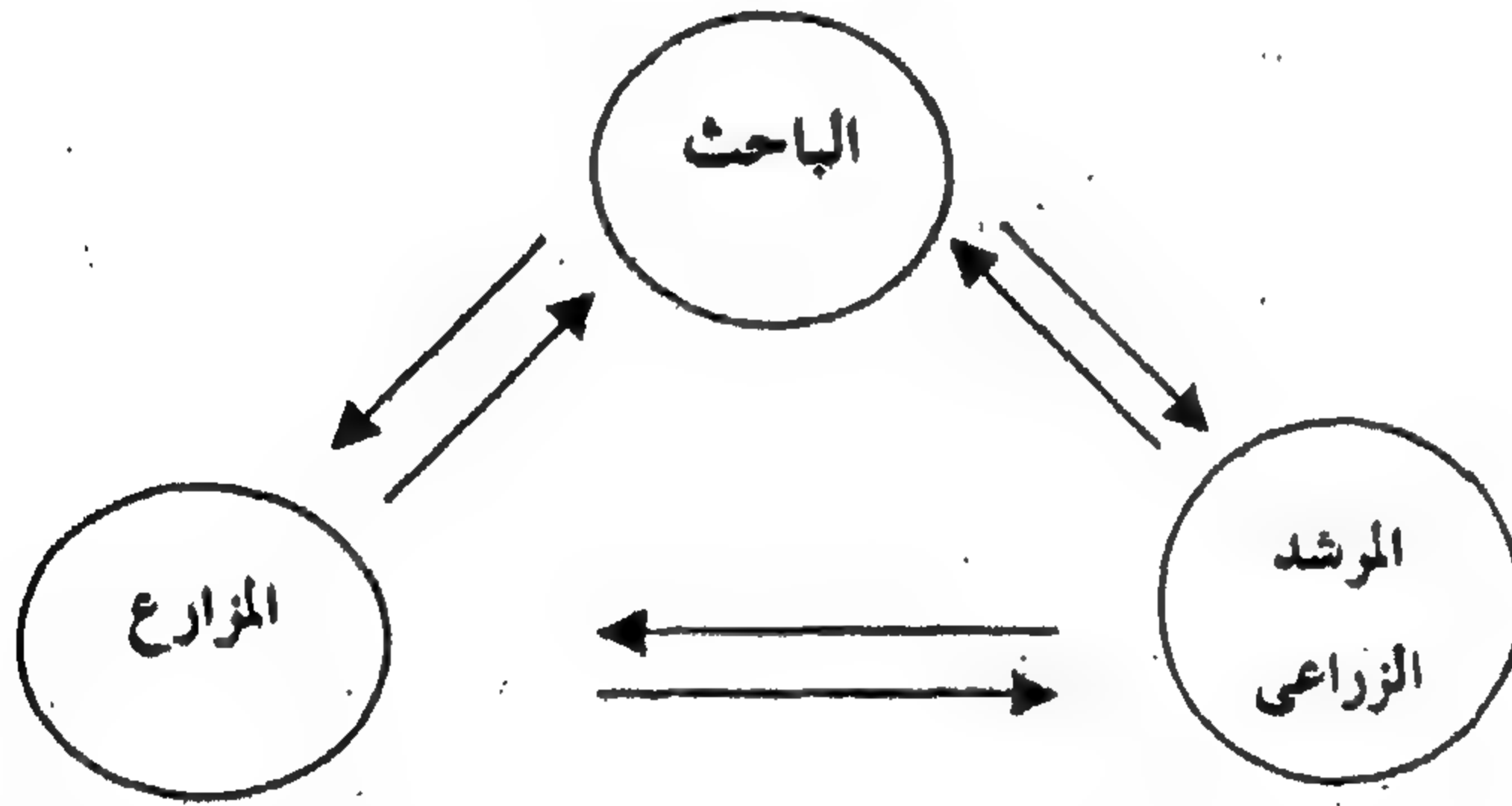
يتم تجهيز المنتج التجاري كي يصبح في صورة مناسبة وسهلة الاستخدام للمزارع - حيث يتم التجفيف بالتبريد تحت ضغط ثم اضافة المواد المحسنة كالمواد المبللة والحاملة والناشرة والواقية من اشعة الشمس.

مراقبة الجودة تتم من خلال عد جراثيم البكتريا والفطريات او جزيئات الفيروس سواء بالشريحة الميكرومترية او باستخدام طريقة الاليزا. ثم يعبا المنتج في عبوات تتمشي مع احتياجات المزارعين. كما يتم اجراء اختبارات الامان الحيوي للمنتج بالتعاون مع المختصين في اختبار سمية المبيدات بالمعمل المركزي للمبيدات من حيث التأثير علي وظائف الكبد والكلبي والانزيمات والبروتينات وغيرها من اختبارات الامان الحيوي.

د- الاهتمام بالوعي التثقيفي الزراعي (الارشاد الزراعي)

اهتمت وزارة الزراعة بالتعاون مع وزارة التعاون الدولي بالاعلام الزراعي الموجه سواء من خلال الاذاعة والتليفزيون ببث البرامج الاذاعية التي تقدم الخدمات الارشادية للمزارعين المصريين كما هو الحال في برنامج صباح الخير يا مصر او برنامج سر الارض التي تقدم المعلومات العلمية لادارة الزراعة بطريقة سهلة ومبسطة - كما تقدم الجرائد والصحف المعلومات الحديثة عن المجالات المختلفة في الزراعة كما هو في صفحة مصر الخضراء بجريدة الاهرام والمجلة الزراعية وجريدة التعاون وبذلك يصبح المزارعون على علم ودراية بكل ما هو جديد في مجال الانتاج ومكافحة الحشرات والامراض.

لم يقتصر دور وزارة الزراعة على الاعلام بل زاد الاهتمام بالجانب التدريبي لمهندسي الارشاد الزراعي والعاملين في مجال وقاية النباتات في المحافظات المختلفة عن طريق الباحثين المختصين وذلك لرفع كفاءة المتدربين في مجال ترشيد استخدام باعترارهم حلقة الوصل بين العاملين في مجال البحوث والمزارعين ، بل تخطى التدريب الي مستوى المزارعين من خلال المدارس الحقلية (FFS) Farmer field school علي ارض الواقع حتي يمكن للزراع التعرف علي الافات وكيفية علاجها.



شكل (٩-١): نظام الارشاد بالمشاركة لنقل تكنولوجيا مكافحة البيولوجية للافات الزراعية

هـ- الاهتمام بالمشاريع البحثية والوحدات البحثية التي تعتمد علي وسائل مكافحة البيولوجية

تنفق مصر بالتعاون مع المنظمات الدولية مثل المنظمة العربية للتنمية الزراعية والحكومية الامريكية وهيئة المعونة الغذائية الفرنسية وغيرها من منظمات ما يقرب من

٢٠٠ مليون جنيه علي المشاريع البحثية التي تهتم بتطوير اساليب مكافحة البيولوجية للافات الزراعية مثل مشروع مكافحة البيولوجية لفرشة درنات البطاطس ، ومشروع اسد المن ، مشروع ابو العيد ومشروع ذبابة الفاكهة ومشروع النيماطودا الممرضة للحشرات وفيروس دودة القطن ومشروع سوسة النخيل الحمراء بالاضافة الي العديد من المشروعات البحثية في مجال الامراض ومكافحة الحشائش.

و- تعاون مصر مع المنظمة العربية للتنمية الزراعية التابعة لجامعة الدول العربية في العديد من المشاريع البحثية للحد من المبيدات:

حيث لعبت مصر دورا هاما في عقد الندوة القومية للخبراء العرب في مجال المبيدات ووقاية النباتات في الفترة من ١٢-١٤ يونيو ١٩٩٤ لمناقشة اوراق العمل الخاصة بوقاية النباتات وترشيد استخدام المبيدات والاضرار الناجمة عنها.

* دور القطاع الخاص في مجال مكافحة الحيوية

نظرا للتقدم الهائل في الزراعة المصرية خلال السنوات السابقة واتجاه وزارة الزراعة نحو ترشيد استخدام المبيدات الكيماوية والذي نتج عنه اتجاه كثيرا من المنتجين الي ما يسمى بالزراعة الحيوية للحصول علي منتجات زراعية نظيفة من التلوث بالمبيدات سواء للاستهلاك المحلي او بغرض التصدير مما شجع المستثمرين الي الدخول في تكنولوجيا انتاج المبيدات الحيوية (جدول ٩-٤)

جدول رقم (٩-٤): المركبات الحيوية المستخدمة في مكافحة الآفات والمنتجات في مصر

| المركب | المسبب المرضي | الشركة المنتجة |
|----------------|------------------------------------|---|
| البروتكتو | Bacillus thuringiensis kurstaki | وحدة المبيدات الحيوية-معهد بحوث وقاية النباتات |
| الاجرين | Bacillus thuringiensis Egypti | معهد الهندسة الوراثية-النصر للكيماويات الدوائية |
| بيوفار | Beauvaria bassiana | وحدة المبيدات الحيوية-معهد بحوث وقاية النباتات |
| بيوكانزا | Beauvaria bassiana | شركة كانزا |
| البيوفلاي | Beauvaria bassiana | شركة النصر للأسمدة والمنتجات الحيوية |
| البيوسكت | Beauvaria bassiana | كفر الزيات للأسمدة والكيماويات |
| بيورانزا | Metarhizium anisoplae | وحدة المبيدات الحيوية-معهد بحوث وقاية النباتات |
| فيروتكنو | فيروس فراشة درنات البطاطس | وحدة المبيدات الحيوية-معهد بحوث وقاية النباتات |
| فيروسيت | فيروس دودة ورق القطن | وحدة المبيدات الحيوية-معهد بحوث وقاية النباتات |
| البلانتا جاردا | Trichoderma spp | شركة النصر للأسمدة والمنتجات الحيوية |
| التريكو | Trichogramma | الشركة الدولية للزراعة الحيوية |

جدول (٩-٥): الآفات الرئيسية التي تستهدفها مكافحة الحيوية

| الآفة | المحصول | الآفة | المحصول |
|--|----------|---|-----------------|
| دودة ورق القطن دودة اللوز القرنفلية | القطن | الحشرة القشرية الرخوة دودة القصب الكبيرة | القصب |
| فراشة درنات البطاطس | البطاطس | دودة ثمار العنب دودة ورق القطن | العنب |
| الخسيرة - الاقسيا - ابو دقيق الرمان | النخيل | صانعات الأنفاق | الموالح |
| العنكبوت الاحمر | الفراولة | آفات المخازن | الحبوب المخزونة |

* الكائنات الممرضة المستخدمة في برنامج مكافحة الحيوية

البكتريا - الفيروسات - الفطريات

جدول (٩-٦): استخدام المركبات الميكروبية لمكافحة الآفات في مصر

| المركب الحيوي | الآفة | المحصول | معدل الاستخدام |
|---------------|--|--|--|
| اجرين | دودة ورق القطن دودة ورق القطن | بنجر السكر القطن | ٢٥٠ جرام للفدان ٥٠٠ جرام / فدان |
| بروتكتو | دودة ورق القطن دودة يرقات البطاطس دودة البعلح الصفري (الخميرة) دودة ثمار العنب | بنجر سكر - القطن بطاطس (حقول ومخزن) نخل عنب | ٣٠٠ جرام / فدان ٣٠٠ جم/فدان ، ١٥٠ جم / طن ٦٠٠ جرام / فدان ٣٠٠ جرام/٤٠٠ لتر ماء |
| دايبل | دودة ورق القطن | قطن | ٢٠٠ جرام / فدان |
| نيمكس | ذبابة البصل الكبيرة | بصل (مخزن) | ٥٠٠ سم ٣ / طن |
| بيوفلاي | الأكاروس الاحمر العادي | قطن - بطيخ - فاصوليا | ٢٠٠ سم ٣ / ١٠٠ لتر ماء |
| فيرتيمك | الأكاروس الاحمر العادي | قطن - موالح | ٤٠ سم ٣ / ١٠٠ لتر ماء |
| ايكوتك - بيو | دودة ورق القطن | برسيم - بطاطس | ٣٠٠ جرام / فدان |
| دايبل | دودة ورق القطن | برسيم | ٢٠٠ جرام / فدان |
| نات - ١ | الأكاروس الاحمر العادي | قطن - فراولة | ١ لتر / ١٠٠ لتر ماء |

* المحاصيل التي تطبق فيها مكافحة الحيوية

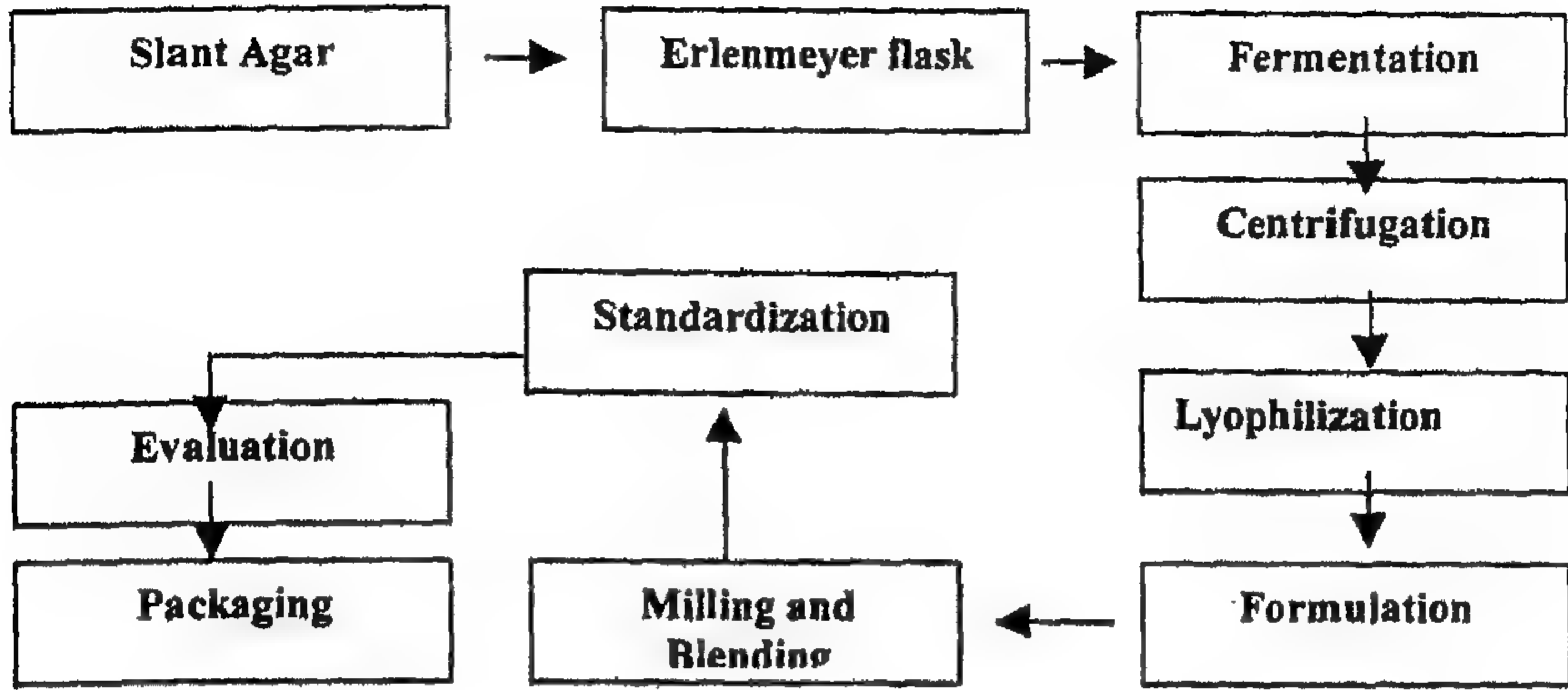
القطن - البطاطس - النخيل - قصب السكر - العنب - الفراولة - الموز -

الموالح.

* التقانات المستخدمة في إنتاج المركبات الحيوية البكتيرية

يوضح الشكل رقم (٩-٢) الخطوات المختلفة لإنتاج بكتريا *Bacillus*

thuringiensis kurstaki او المركب الحيوي "بروتكتو" حيث يعتمد نظام الانتاج علي عملية تخمر باستخدام مواد محلية من البيئة المصرية بحيث تكون رخيصة الثمن وتحتوي علي الاحتياجات الغذائية اللازمة لتكاثر ونمو وتجراثم البكتريا من الكربوهيدرات والبروتينات والفيتامينات والاملاح المعدنية. وتتشابه خطوات انتاج الفطريات في بعض المراحل ما عدا الاختلاف في البيئة المستخدمة.



شكل رقم (٩-٢): الخطوات المختلفة لإنتاج مركب البروتكتو الذي يحتوي على *Bacillus thuringiensis kurstaki*.

المحور الثالث: المشاكل والمعوقات التي تواجه استخدام مكافحة الحيوية في مصر
المعوقات الفنية:

١- نقص الخبرة عن الوسائل الحيوية

حتى الآن معظم العاملين في مجال مكافحة الآفات ليس لديهم المعرفة الكافية عن انسب الظروف للتعامل مع المنتج الحيوي من حيث توقيت الرش والآلة المستخدمة في التطبيق وكذلك الطور الحساس من الآفة المراد مكافحتها - عدم توفر الخبرة الكافية عن طبيعة العلاقة بين المسبب المرضي والآفة مثل كيفية حدوث الفعل السام أو الإبادي على الآفة والتأثيرات الجانبية على تطور الحشرات وما هي درجة تخصص المسبب المرضي من آفة لأخرى ، بالإضافة إلى ذلك عدم معرفة العوامل البيئية التي تؤثر في فعالية المسبب المرضي ومدة بقائه تحت الظروف الحقلية - نقص المعلومات عن تأثير مكونات العائل النباتي المعامل الذي تتغذى عليه المسبب المرضي ... عدم توفر تلك المعلومات لدى الباحث أو المهندس الزراعي يمكن أن يلعب دورا كبيرا في عدم نجاح المسبب المرضي في مكافحة الآفة تحت الظروف الحقلية.

٢- درجة تخصص السلالات Lack of Specificity

من الأخطاء الشائعة الآن في مجال مكافحة البيولوجية استخدام مركب واحد ضد أكثر من آفة حشرية دون ملاحظة أن هناك درجة كبيرة من التخصص في فعالية تلك

المركبات فعلي سبيل المثال في حالة استخدام بكتريا الباسيلس *Bacillus thuringiensis* فان الاختلاف في تحت النوع Sub-species تلعب دورا هاما في الفعالية من افة لاخري وذلك للاختلاف في تركيب البلورات السامة التي تنتج بالبكتريا حيث ان هناك ثلاثة اقسام رئيسية للبلورات السامة هي Crystal I (Cry I) والتي تعتبر فعالة علي الحشرات التابعة لرتبة حرشفية الاجنحة Lepidoptera ، اما النوع الثاني Cry II فهو فعال ضد الحشرات التابعة لرتبة حرشفية الاجنحة وثنائية الاجنحة ، والنوع الثالث CryIII فهو فعال ضد الحشرات غمدية الاجنحة Cloeoptera والنوع الرابع CryIV فهو فعال ضد الحشرات التابعة لرتبة ثنائية الاجنحة Diptera - هذا بالاضافة الي ان مكونات كل نوع من البلورات بما تحتوي من بروتين سام ودرجة توافق تلك البروتينات مع الفتحات الموجودة علي الشعيرات المبطنة للمعي الاوسط وكذلك درجة حموضة المعدة ودرجة نشاط انزيمات تحليل البروتين تلعب دورا في فعالية سلالة ما من البكتريا علي الحشرات المختلفة، ولذلك من الخطأ ان تستخدم سلالة فعالة ضد حشرات حرشفية الاجنحة ضد افات المخازن من السوس التابع لرتبة مدية الاجنحة او الاكاروس كما يحدث في بعض الدراسات التي تمت بواسطة غير المختصين حيث يكون التأثير في هذه الحالة راجع للاضافات الاخري في المركب وليس للبكتريا. بالنسبة للفطريات لابد من دراسات موسعة لمعرفة درجة التخصص علي الحشرات المختلفة وان كانت ميكانيكية التأثير واحدة من خلال جدار الجسم حيث يتم الاحتراق ثم الانتشار والتغذية والتكاثر علي محتويات الحشرة الداخلية.

٣- نوع المستحضر Type of Formulation

نوع المستحضر يلعب دورا اساسيا في درجة بقاءة فعالا تحت ظروف التخزين فالمركبات البكتيرية التي تكون في صورة مساحيق قابلة للبلل تكون فترة بقاءها تحت ظروف التخزين اطول من تلك التي تكون في صورة سائلة سواء في صورة مائية او زيتية حيث ان توفر الرطوبة يعمل علي نشاط المسبب المرضي باستمرار وفي بعض الاحيان تكون الصورة التي يوجد عليها المسبب المرضي غير مرضية للافة كما حدث في مصر بالنسبة لاحد المستحضرات الفطرية والتي تحتوي علي فطر Beauvaria Bassiana حيث حقق هذا المركب خلال موسم ١٩٩٧ نتائج جيدة في مكافحة الذبابة البيضاء علي محصول القطن حيث كان المنتج حديثا مما دعا الشركة المنتج الي تجهيز كميات كبيرة لموسم ١٩٩٨ وخزنت لفترات تزيد علي ٦ اشهر ولكنها عند التطبيق لم تعطي اي كفاءة علي الذبابة البيضاء مما افقد ثقة الزراع في المنتج ، كما انه يكون من

الصعب تجهيز بعض المبيدات الحيوية في صورة مستحضرات تجارية كما هو الحال في حالة النيماتودا بالرغم من فعاليتها تحت الظروف المعملية ، بالنسبة للأعداء الحيوية من الطفيليات والمفترسات بالرغم من العديد من النجاحات التي تحققت في مصر باستخدام الطفيليات والمفترسات الا ان عملية انتاجها وتسويقها لازالت تواجهها بعض المشكلات مثل انتاجها بكميات كبيرة وخاصة انها تحتاج الي تجهيزات مكلفة من مباني وبيئات لتربية عوائلها المفضلة وجهد لا قناع المزارعين واوقات معينة للاطلاق بما يتناسب مع عوائلها من الحشرات حتي يمكنها من البقاء تحت الظروف الحقلية.

٤- قصر فترة بقاء المركب Low Persistence

من الخواص المميزة للكائنات الميكروبية من البكتريا والفطريات والفيروسات ان مدة بقائها في الحقل قصيرة بالمقارنة بالمبيدات وهذا يقلل من اقبال المزارعين عليها مما يتطلب برفع الوعي لدي الزراع عن ان تاثير هذه المركبات تراكمي فبالرغم من ان نسبة كبيرة منها تفقد خلال فترة وجيزة بعد الرش الا ان المتبقي من تلك الافراد له القدرة علي التكاثر في الوسط المعامل او نتيجة اعادة انتشارها من الافراد الحشرية التي اصبحت بها وهذه الظاهرة تسمى بظاهرة ال Epizitotic مما يساعد في احداث عدوي مرة اخري للحشرات. كما ان مكونات المبيد الحيوي المضافة للمستحضر تلعب دورا في طول مدة بقاءة وبخاصة المواد الواقية من الاشعة فوق بنفسجية والتي تلعب دورا هاما في موت تلك الكائنات.

٥- المدى العائلي Host range

المدى العائلي لمعظم المركبات الحيوية يعتبر محدود بالمقارنة بالمبيدات مما يجعل عملية مكافحة معقدة في بعض الاحيان وخاصة عند وجود اكثر من افة للمحصول ويتطلب التدخل بالمبيدات لمكافحة تلك الافات بخلاف المبيدات حيث اعتاد الزراع علي استخدام مبيد واحد لمكافحة اكثر من افة في نفس الوقت.

٦- تكاليف الانتاج في الدول النامية

يحتاج انتاج المركبات الحيوية سواء التي تحتوي علي كائنات ميكروبية او تلك التي تعتمد علي المركبات الحيوية الكيميائية الناتجة من تخمر الميكروبات الي تكنولوجيا عالية

للفصل والتعريف للنواتج المختلفة والتجهيز وبالتالي فهي تعتبر مكلفة في الكثير من الدول النامية.

٧- عدم وجود بروتوكولات مراقبة الجودة

عدم توفر البروتوكولات الخاصة بتقييم المركبات الحيوية مثل دراسة خواص البروتينات السامة في البكتريا او نواتج تمثيل الفطريات او تقدير جزيئات الفيروس وكذلك طرق اخذ العينات وكيفية حفظ المنتج النهائي وانسب الطرق في تقييم تلك المركبات معمليا وحقليا يجعل من الصعب تقارب النتائج المتحصل عليها في الاماكن المختلفة من محطات التقييم في المعامل والحقول.

المعوقات الاقتصادية:

تتمثل المعوقات الاقتصادية في عدم اقبال شركات انتاج المبيدات الكيماوية او رجال الاعمال علي الاهتمام بانتاج تلك المركبات لعدة اسباب اهمها تعود شركات انتاج المبيدات علي تسويق الاف الاطنان من المبيدات سواء للسوق المحلي او التصدير مما يحقق ارباح طائلة من تلك العملية في فترات قصيرة ، ولكن نظرا لان المركبات الحيوية لازالت تحتاج الي مجهود كبير والنجاحات التي تحققت تعتبر ضئيلة بالنسبة للمبيدات فان معظم الشركات تعتبر الدخول في انتاج تلك المركبات عملية خاسرة.

المعوقات الطبيعية:

الظروف البيئية تعتبر عوامل مؤثرة في نجاح استخدام تلك المركبات وخاصة التي تحتوي علي كائنات حية من البكتريا والفطريات والفيروسات مما يستلزم دائما البحث عن سلالات من البيئة المحلية تتحمل الظروف البيئية السائدة والتغلب علي احتمالات ظهور صفة المقارنة لتلك المركبات مع تطوير صورة المنتج باستمرار حتي يمكن مقارنة الظروف البيئية المعاكسة.

المعوقات المؤسسية:

عدم توفر الدعم المادي الكافي للتطوير المستمر في مجال بحوث التكنولوجيا الحيوية وخاصة ان الدراسات في هذا المجال تعتبر مكلفة.

المحور الرابع: المقترح التطويري لاستخدام مكافحة الحيوية في الحد من تلوث البيئة في مصر

خلفية:

نظرا لان المبيدات الميكروبية اصبحت حجر الزاوية في برنامج مكافحة المتكاملة للآفات لما لعناصر مكافحة البيولوجية المختلفة من تخصص تجاه عوائلها الحشرية وعدم اضرارها بالحشرات النافعة قد دفع بجذب الاهتمام اليها، حيث ان انماط مختلفة منها استعملت لعديد من السنوات دونما ثمة تأثير بيئي غير مرغوب فيه، وذلك بالرغم من لك الحقيقة والكم الهائل من البحوث المتعلقة بهذا المجال لم تاخذ المبيدات الميكروبية طريقها المنشود الي السوق التجاري والذي يتناسب مع اهميتها وذلك بسبب قصر مدة بقائها تحت الظروف الحقلية وبطئ تأثيرها علي الآفات مما يجعل اكثر من الزراع اكثر تخوفا من استخدامها مما يحتاج الي بذل المزيد من الجهود. للحصول علي افضل النتائج من استخدام مكافحة البيولوجية فمن الضروري توفر برامج متنوعة متكاملة *integrated Diverse* (IDP) *Programmes* تعتمد علي الاعداء الطبيعية والكائنات الميكروبية (بكتريا - فطريات - فيروسات) بجانب الجائبات الجنسية، ولتحقيق ذلك يلزم اتخاذ بعض الاجراءات التالية:

الاستراتيجية

يجب الاخذ في الاعتبار ان استخدام الكائنات الميكروبية في مجال مكافحة الآفات تعتبر احد انواع التكنولوجيا الموجهة واتي تعتمد علي ضرورة توفر الانتاج في اوقات محددة وبافضل صورة حتي يفي بالغرض المستخدم من اجلة وهذا يتطلب ما يلي:

- 1- الاهتمام بعلوم التكنولوجيا الحيوية *biotechnology* خاصة في مجالات البروتين والتعديل الوراثي *genetic modification* حيث ان ذلك سوف يساعد في معرفة الانواع المختلفة من البروتينات السامة لكل سلالة بكتيرية وبالتالي درجة فعاليتها علي الآفات المختلفة مع الاخذ في الاعتبار درجة حساسية الاطوار المختلفة للآفات وكذلك تأثير العائل النباتي الذي تتغذي عليه الحشرة علي فعالية البكتريا ، كما ان التعديل الوراثي سوف يساعد في زيادة فعالية السلالات البكتيرية من خلال ادخال اكثر من جين وبالتالي تستطيع السلالة الواحدة ان تنتج اكثر من توكسين نو فعالية علي اكثر من افة. وفي حالة الفيروسات يمكن تحسين مدة بقاء الفيروس تحت الظروف الحقلية مع زيادة فعاليتها من خلال ادخال بعض

الجينات الوراثية من الكائنات الاخرى مثل الجينات المؤلة عن افراز المواد السامة في العقرب او النحل او بعض انواع الدبابير.

٢- تطوير البحوث العلمية في مجال الميكروبيولوجي من حيث البحث المستمر عن الكائنات الميكروبية (بكتريا - فطريات - الفيروسات) الممرضة للافات علي مستوي القطر الواحد وبالتالي عمل خريطة جغرافية لتلك المسببات حتي يمكن توفر المعلومات الاولية عن امكانية نجاحها في كل منطقة طبقا للظروف المناخية السائدة والتي تختلف فيها الافات الحشرية بناءا علي اختلاف العوائل المنتشرة بها. كما ان هذا الحصر الجغرافي للمسببات المرضية يمكن ان يساعد علي معرفة الكائنات المنتشرة علي مستوي الوطن العربي لمعرفة مدي امكانية تبادلها واستخدامها في اكثر من دولة بالوطن العربي لمكافحة الافات المتشابهة في تلك الدول.

٣- زيادة الميزانيات الخاصة بتطوير البحوث العلمية التطبيقية في مجال مكافحة الحيوية للافات وتبني المنظمة العربية للتنمية الزراعية فكرة انشاء رابطة العاملين في مجال مكافحة البيولوجية مما يمكنهم من التبادل المستمر للمعلومات والبحوث حتي يمكن توحيد طرق تسجيل وتداول ومراقبة الجودة للمركبات الحيوية حتي يمكن تجنب ما يستجد من مشكلات قد تتجم عنها علي المدي البعيد مثل ظهور صفة مقاومة الافات لتلك المركبات.

٤- ضرورة تعاون الباحثين في التخصصات المختلفة مثل مكافحة الافات والحشرات والامراض والميكروبيولوجيا الزراعية والتكنولوجيا الحيوية لان ذلك سوف يساعد في معرفة درجة تخصص المسببات المرضية وميكانيكية احداث الفعل السام لها علي الحشرات وكذلك درجة تحملها للظروف البيئية المختلفة وبالتالي العمل علي تحسين صورة المنتج التجاري بما يحقق افضل النتائج علي المستوي التطبيقي.

٥- تنشيط دور القطاع الخاص والاستثمار في عملية انتاج المركبات الحيوية بصورها المختلفة مثل انتاج بكتريا الباسيلس بما يخدم الدول العربية في ظل سياسة التجارة الحرة وانشاء السوق العربية المشتركة.

الاهتمام بالتدريب المستمر للمهندسين لزيادة مفهوم مكافحة الحيوية وكيفية العمل علي انجاحها وظروف التطبيق الامثل وربط ذلك بكلا من سلوك وبيولوجية

REFERENCES

- Abdella, M.M.H. (1976). Biological control on certain natural enemies attacking of some stored product pest insets. Entomophagous insects attacking *Anagasta kuhniella* Zeiler in Alexandria mills and silos with particular refemce to the morphological, biological and ecological aspects of *Allaeocrafwm bianmiipes* (Montrouzier and Signoret) under laboratory conditions. M.Sc., Thesis. Fac. Agric. Alexandria, Univ.
- Abdella, M.M.H. (1981). Natural enemies of major stored product pests, with (reuter) (*Anthocoridae*) and *Allaeocranum bianrnliipes* (Montrouzier et Signoret) (*Teduviidae*). Ph.D., Thesis. Fac Agric. Cairo. Univ., 212 pp. Abd El-Hafez, Alia (1995). A comparison of thermal requirements and some biological aspects of *Trichogramma evanescence* Westwood and *Trichogramma bactrae* Nagagja from egg of pink and spiny bollworms. Agric. Sci., A in Shams Univ., Cairo, 40:901-912.
- Abd El-Hafez, Alia and M.A. Nada (2000). Augmentation of *Trichogrammatouidea bactrae* Nagaraia in the IPM programme for control of pink bollworm, *Pectinophora gossypiella* (Saund.) in Egypt. In Proceedings Beltwide Cotton Conference at San Antonio, TX, America; January, 4-8, pp. 1009-1014.
- Arafa, M. (2002). Personal communication
- Bekheit, H.K.; Alia Abd El-Hafez; Suzan H. Taher and Moawad, G.M. (1995):Potency of Some New Isolates of *Bacillus thuringiensis* Against the Pink and Spiny Bollworms. Annals Agric. Sci., Ain Shams Univ., Cairo, 40:411-416.
- Bekheit, H.K.M f/PPP/Production technology of *Bacillus thuringiensis* and granulosis virus for the control of certain economic pests in Egypt Adv. Agric. Res. Egypt, 2 (2): 136-187. Bekheit, H.K.M. ; A.M. Mabrouk; S. Abd El-Haleem

- and R. El-Bedewy (2000): Using of *Bacillus thuringiensis* and Granulosis Virus for Control of Potato Tuber Moth, *Phthorimaea operculella* (Zeiler) in Egypt, African Potato Association, Conference Proceedings, Vol., 5:243-249.
- Benbrook, C.M. (1996). Pest Management at the Crossroads Consumer Union, Yonkers, new York.
- Brown, L.M.; Gibson, A.; Evert, R.; Cantor, G.D.; Schumann, K.P.; Burmeister, L.M.; Van Lier, L.F. and Dick, F. (1990). Pesticide exposures and other agricultural risk factors for leukemia among men in Iowa and Minnesota, Cancer Research, 50:6585-6591.
- Cantor, K.P., Blair, A.; Everett, G.; Gibson, R.; Burmeister, L.F.; Brown, L.M.; Schumann, L. and Dick, F.R. (1992). Pesticides and other agricultural risk factors for non-Hodgkin's lymphoma among men in Iowa and Minnesota, Cancer Research, 52:2447-2455.
- El-Amaouty, S-A.; Nevien, Gaber and Tawfik, M.F.S- (2000*). Biological control of the green peach aphid, *Myzus persicae* by *Chrysoperia carnea* (Stephens) Sensulato (Neuroptera:Chrysopidae) on green pepper in greenhouses in Egypt Egypt. J. Biol. Pest. Control, 10:109-121.
- El-Arnaouty, S-A.; Beyssat-Amaouty, V.; Ferran, A. and Galal, K (2000^b). Introduction and release of the coccinellid, *Harmonia axyridis* Pallas for controlling *Aphis craccivora* koch on faba beans in Egypt. Egypt. J. Biol. Pest. Control, 10:129-136.
- El-Husseini, M.M.; Schumann , K. and Sermann, H. (1993). Rearing immature feeding stage of *Or ins majesculus* reut. (Heteroptera: Anthocoridae) on the acarid mite, *Tyrophagus puntriscentiae* Schr. As new alternative prey. El-Husseini, M.M.; Agamy, E.A.; Bekheit, H.K. and Naglaa A.M. Omar (2000): Efficacy of three *Bacillus thuringiensis* Berliner soil isolates against young larvae of *Spodoptera Uttoralis* (Boisd.) on two host plants. Egyptian J. Biol. Pest Control 10 (2): 103-107.
- El-Husseini. M.M.; Agamy, E.A.; Bekheit, H.K. and Naglaa A.M. Omar (2000): 13 against the cotton leaf worm,

Spodoptera littoralis (Boisd.), Egyptian J. Biol. Pest Control.[^] (2):97-10L

El-Sebae, A.H. (1989). Fate and undesirable effects of pesticides in Egypt. *Ecotoxicology and Climate*, SCOPE, 38:359-371.

FAO (1994) 1993 production yearbook Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.

Fayad, Y.H.; Hafez, M. and El-Kifl, A.H. (1979). Survey of the natural enemies of the three corn borers, *Sesamia cretica* Led., *Chilo Agamemnon* Bles. And *Ostrinia nubilalis* Hbn in Egypt. *Agric. Res. Rev. Cairo*, 67:29-32.

Georghiou, G.P. (1986). The Magnitude of Resistance Problem. *Pesticide Resistance, Strategies and Tactics for Management* National Academy of science, Washington, DC, pp. 18-41.

Grue, C.E.; Fleming, W.J.; Busby, D.G. and Hill, E.F. (1983). Assessing hazards of organophosphate pesticides to wildlife. *Trans, N. Aft Wildt, nat. res. Conf.* 48:200-220.

Hamed, A.R.; Reckhaus, P.M.; Mahrous, F.n.; Soliman, N.Z. and Gassert, W.A. (1998). Successful biological control program for the control the citrus leafminer, *Phyllocnistis citrella* Staintin (Lepidoptera:Garcillariidae) in Egypt. *Proceeding of the first regional Symposium for Applied Biological Control in Mediterranean Countries*, Cairo University, October, 1998, pp. 139-146.

Hudson, r.h.; Tucker, R.K. and Haegele, M.A. (1984). Handbook of toxicity of pesticides to wildlife, U.S. fish Wildl. Sen Resource Publ., No. 153.

LeBaron, H.M. and McFarland, J. (1990). Herbicide resistance in weeds and crops. In Green, M.B., LeBaron, H.M. and Moberg, W.K. 9Ed's.) *managing Resistance from fundamental research to Practical Strategies*. American Chemical Society, Washington, DC, pp. 336-352.

- Moawad, G.M.; Comma, M.B.; Ashour, M.B. and Bekheit, H.K.M. (1994): Mating Disruption Trials for the Control of Pink Bollworm, *Pectinophora gossypiella* (Saund.). 5th Conf. Agric. Dev. Res., Fac. Agric., Am Shams Univ., Cairo, Egypt, 2,1079-1094.
- Moawad, G.M.; E.A. Gomma; Ashour, M.B. and Bekheit. H.K.M (1994): Integrated Use of Pheromone and Conventional Insecticides Against Pink Bollworm. 5th Conf. Agric. Dev. Res., Fac. Agric., A in Shams Univ., Cairo, Egypt, 2,1025-1044.
- Moawad, G.M.; El-Bedawy; R.A; Bekheit, H.K.M. and Lagnau, A. (1997):
 Biological Control of the Potato Tuber Moth, *Phthorimaea operculella* (Zettl.) in Potato fields and Storage. Agric. Res. Review, Plant Protection . 75(4):923-938.
- Pimentel, D.; Acquay, H. and Biltonen, M. (1993). Assesment of environmental and economic impacts of pesticide use. In the Pesticide Question. Environment. Economics and Ethles, (eds. D. Pimentel and H. Lehman), Chapman & Hall, New York. Pp-47-84.
- UNEP (1991). Enviromental data report. Blackwil, Oxford.
- WHO/UNEP (1989). Public Health Impact of Pesticides Used in Agriculture, Worled Health Organization/United National Environmental Programme, Geneva.

A

G

E

R

I

N

®

®

أجيري

مبيد حشري للحدائق



كيف يقضى أجيرين على الحشرات

عند تقذية اليرقات على أجزاء النبات المعامل
بمركب **أجيرين** يتم تفاعل بين مادة **أجيرين**
ومستقبلات متخصصة على الغشاء المبطن للقناة
الهضمية الوسطى لليرقة حيث تبدأ سلسلة من
التفاعلات البيوكيميائية ينتج عنها أحداث تقوي
بالجدار المبطن للقناة الهضمية مما يؤدي إلى خلل
في النظام الأيوني للحشرة وتسبب اليرقة عن
التغذية ثم تموت خلال يوم أو يومين على الأكثر.

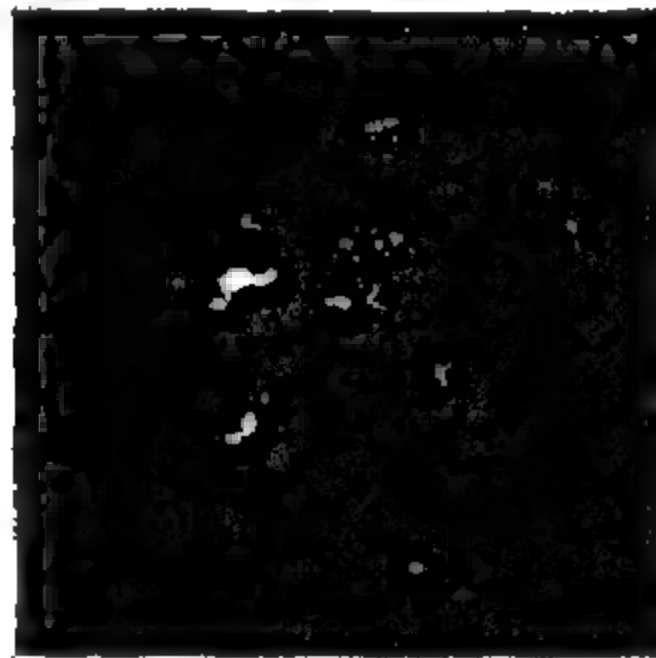
استخدامات أجيرين®

• دودة فراشة درقات البطاطس.

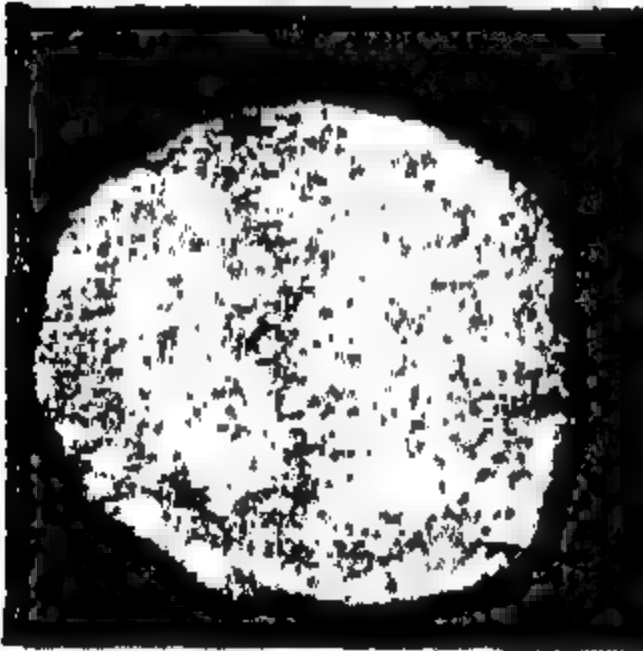
- في الحقل، عند ظهور الفقس الحديث يتم الرش بمعدل ٢٠٠ جرام أجيرين للفدان قذاب في ٢٠٠ لتر ماء.
- في النواتج والمراور، بعد التخلص من الدورات المصابة يستخدم ١٥٠ جرام من أجيرين لكل طن بطاطس تعشيرا على الدورات.

• دودة ورق القطن وديدان اللوز.

- فور ظهور الفقس الحديث يتم رش أجيرين بمعدل ٢٥٠ جرام في ٢٠٠ لتر ماء للفدان مع مراعاة رش المجموع الخضري جيدا وتكرار الرش كل عشرة أيام أو عند ظهور الفقس الحديث.



درقات بطاطس مصابة بيرقات فراشة درقات البطاطس



• ينصح باتخاذ الاحتياطات الخاصة بالأمان العام
للقائمين على رش هذا المبيد الحيوي مثل غسل
اليدين بعد الرش.



يرقة سليمة



إرشادات الاستخدام

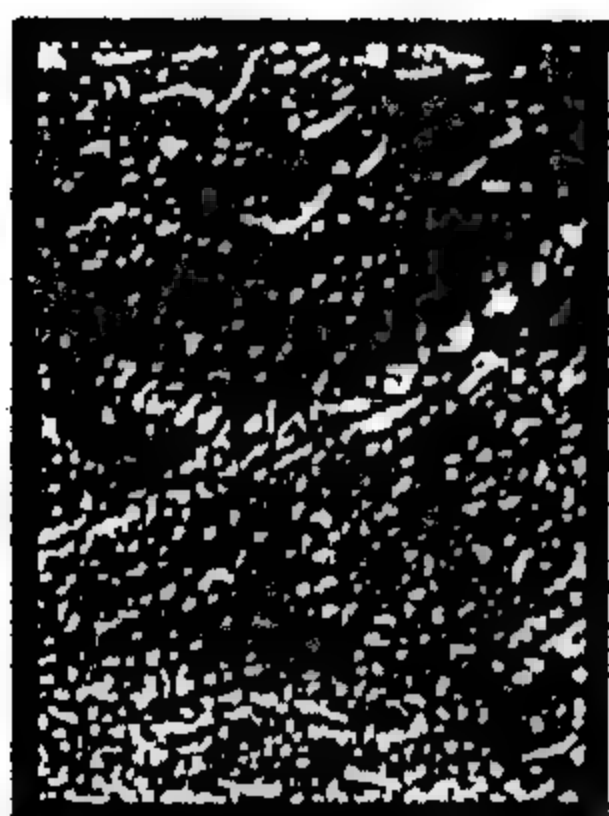
- قبل استعماله يجب التأكد من مطابقة الرشاش من آثار أي مبيد كيميائي آخر.
- تضاف الكمية الموصى بها من على نصف كمية المياه الموصى بها وتقلب جيدا داخل الرشاش ثم يضاف باقي كمية المياه بالكامل.
- في حالة عدم وجود مقلب الموائج يراعى رج الرشاش أو التقليب على فترات وبجيرة لضمان تجانس مع المياه.
- يجب أن يغطي محلول الرش الأسطح العلوية والسفلية لأوراق النباتات المعالجة ويجب أن يتم الرش إما في الصباح الباكر أو المساء لتقليل تأثير أشعة الشمس المباشرة على حيوية **أجيرين**.

ملاحظات عامة

- يخزن أجيرين في مكان جيد التهوية بعيداً عن ضوء الشمس ومعتدل الحرارة (أقل من ٢٥°م).
- يجب مراعاة الطرق المبررة للتخلص من العبوات الفارغة.

أجيرين® الذي الواسع لاستخدام

يستخدم أجيرين بمعدل
٢٥٠ جم/٢٠٠ لتر للمدان



البطاطس
فرشة درنات البطاطس
دودة ورق القطن
الدودة القارضة

الطماطم - المفل - الباذنجان
دودة ورق القطن
الدودة القارضة
دودة ثمار الطماطم

اللوبيا
دودة ورق اللوبيا

الفاصوليا
دودة ورق القطن

الكرفس
دودة ورق القطن

البطيخ

ديدان البطيخ
الخنفساء الحمراء

الزيتون
دودة أوراق الزيتون
الخنفساء الحمراء

الخضروات الخضراء
دودة ورق القطن
حشرشيات الأجنحة الأخرى



القطن

دودة ورق القطن
دودة اللوز القرنطية
دودة اللوز الأمريكية
الدودة القارضة

البرسيم
دودة ورق القطن

الذرة

الدودة القارضة
الثاقبات
دودة ورق القطن

القصيب
دودة القصيب الكبيرة
ثاقبات الذرة
بنجر السكر
دودة ورق القطن
الموالح
دودة أزهار الموالح
عباد الشمس
الدودة القارضة
دودة ورق القطن
العنب
دودة ثمار العنب

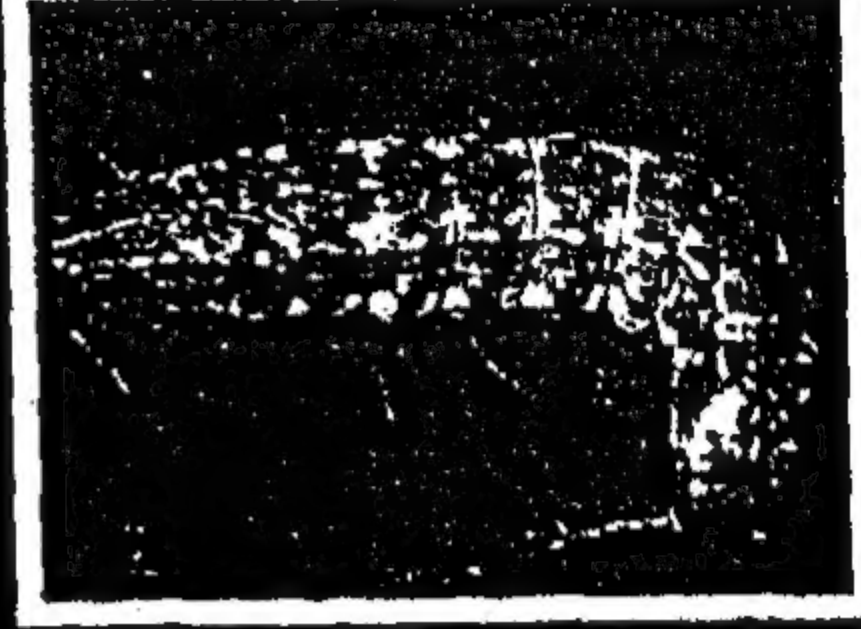
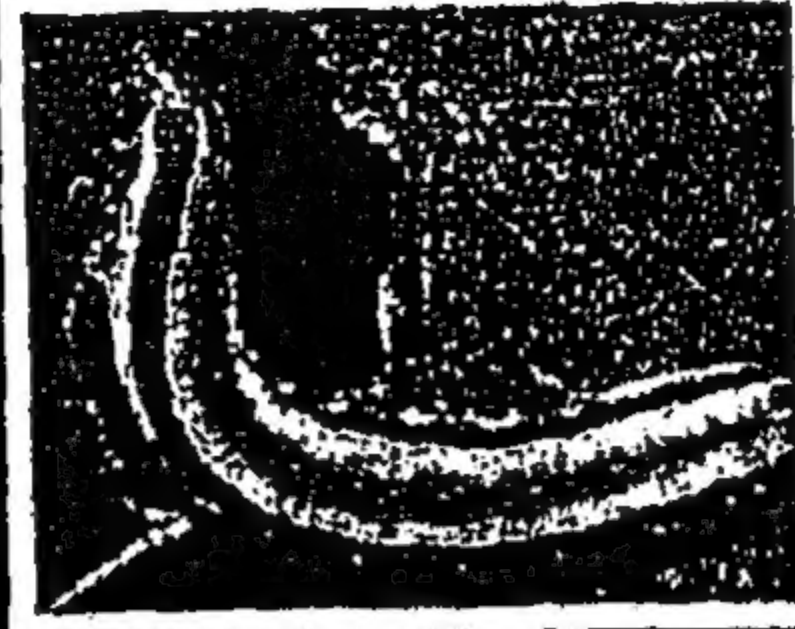


* أجيرين®

صديق للبيئة وغير ضار بالإنسان
أو الحيوان ولا يؤثر على الأعداء
الطبيعية أو الحشرات النافعة.

* أجيرين®

مركب حيوى فعال لمقاومة
العديد من الآفات الزراعية من
رتبة حرشفية الأجنحة.



* أجيرين®

يحتوى على مادة فعالة عبارة عن
باسيليس ثيرنوجينسيس كل
ملليجرام يحتوى على ٢٢٠٠٠ وحدة
دولية من المادة الفعالة.



* أجيرين®

يمكن تناول المحصول فى نفس يوم
رش المركب ويؤدى ذلك إلى حماية
النباتات وحصول المزارع على أكبر
عائد اقتصادى.



* أجيرين® مسجل برقم ٥٨٠ لسنة ١٩٩٧ وموصى به من وزارة الزراعة والمركز الدولى للبىطاطس.

Patent No. 019797
براءة اختراع رقم ٠١٩٧٩٧

BIOGRO INTERNATIONAL - EGYPT
46 Mohey Eldin About Ezz - Dokki - Giza - Egypt
Tel: 3367860

Under license from: Agricultural Genetic Engineering
Research Institute (AGERI) - ARC - Giza - Egypt.

Registration No.: 580/1997

انتاج شركة بيوجرو إيترناشيونال مصر
٢٢١٧٨٠٠ ش. شارع محبى الدين أبوالمز - الدقى - الجيزة

بتصريح من معهد بحوث الهندسة
الوراثية الزراعية
مركز البحوث الزراعية - وزارة الزراعة





أ.د. زيدان هندي عبدالحميد

- بكالوريوس العلوم الزراعية "حشرات" كلية الزراعة - جامعة عين شمس ١٩٦٣ .
- ماجستير العلوم الزراعية "كيمياء مبيدات" كلية الزراعة - جامعة عين شمس ١٩٦٦ .
- دكتوراه فلسفة العلوم الزراعية "مبيدات الآفات" كلية الزراعة - جامعة عين شمس ١٩٦٩ .
- مدرس في علوم وقاية النبات ١٩٦٩ - ١٩٧٤ بكلية الزراعة - جامعة عين شمس .
- أستاذ مساعد في علوم وقاية النبات ١٩٧٤ - ١٩٧٩ بكلية الزراعة - جامعة عين شمس .
- أستاذ في علوم وقاية النبات ١٩٧٩ وحتى الآن بكلية الزراعة - جامعة عين شمس .
- وكيل كلية الزراعة - جامعة عين شمس لشنون الدراسات العليا ١٩٩٢ - ١٩٩٨ .
- مستشار علمي لشركة سوميتومو كيميكل اليابانية للمبيدات منذ ١٩٧٨ وحتى الآن في مصر والدول العربية .
- المشاركة في معظم المؤتمرات المحلية والعالمية في مجالات وقاية النبات - كيمياء المبيدات - مكافحة المتكاملة للآفات - المشاكل الخاصة بالتلوث البيئي .
- المشاركة في العديد من الدورات الخاصة بالتوعية بمخاطر المبيدات والملوثات البيئية الأخرى في مصر والدول العربية الأخرى .
- الأشتراك في المشروعات القومية الخاصة بالمكافحة المستتيرة للآفات والتلوث البيئي والمكافحة الحيوية للآفات .
- عضو في العديد من الجمعيات العلمية في مجالات وقاية النبات والبيولوجية الجزيئية وكيمياء المبيدات والتوكسيكولوجي والمبيدات والتلوث البيئي .

بعض مما نشره أ.د. زيدان هندي :

- | | | |
|------|--------|--|
| ١٩٩٥ | (١) | الاتجاهات الحديثة المبيدات ومكافحة الحشرات ٢ ج . |
| ١٩٩٥ | (٢) | الآفات الحشرية والحيوانية . |
| ١٩٩٦ | (٣) | الملوثات الكيميائية والبيئية . |
| ١٩٩٩ | (٤) | التسمم الغذائي والملوثات الكيماوية . |
| ١٩٩٩ | (٥) | أساسيات وطرق تحليل مبيدات الآفات . |
| ١٩٩٩ | (٦) | انقلاب الجنس وفقد المناعة بين المبيدات والهرمونات . |
| ٢٠٠٠ | (٧) | السمية البيئية والتفاعلات الحيوية للكيمائيات والمبيدات . |
| ٢٠٠٠ | (٨) | المكافحة المستتيرة للأمراض النباتية . |
| ٢٠٠٠ | (٩) | فساد الأرض وتدمير الإنسان . |
| ٢٠٠٠ | (١٠) | هموم الإنسان والبيئة . |
| ٢٠٠٠ | (١١) | الأمراض الفطرية ومكافحة الأمراض النباتية . |
| ٢٠٠٠ | (١٢) | الموارد المائية والاتساخ بالمبيدات . |
| ٢٠٠٠ | (١٣) | ترشيد المبيدات في مكافحة الآفات . |
| ٢٠٠٠ | (١٤) | التكنولوجيا الحيوية والجزيئية في مجابهة الآفات الزراعية والأجهادات البيئية . |
| ٢٠٠٠ | (١٥) | مخاطر المبيدات على الصحة العامة والبيئة . |
| ٢٠٠٠ | (١٦) | السموم النباتية ومكافحة الآفات . |
| ٢٠٠٠ | (١٧) | نسخ وتقليد مبيدات الآفات (القبول - الرفض - التشريع) . |
| ٢٠٠٠ | (١٨) | وبائية التعرض المزمّن للمبيدات بين الصحة العامة والبيئة . |

كانزا جروب



Bibliotheca Alexandrina



1091471